

**Evaluierung des
Lysin-Demethylase-Expressionsmusters
in kindlicher akuter
myeloischer Leukämie**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades**

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Franziska Ebert, geb. Wenske
geboren am 10. September 1990 in Oelsnitz/V.**

Gutachter

1. Prof. Dr. med. James F. Beck, Jena
2. Prof. Dr. med. Marie von Lilienfeld-Toal, Jena
3. Prof. Dr. med. Holger Lode, Greifswald

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15. April 2019

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung	3
2.1 Akute myeloische Leukämie (AML)	3
2.1.1 Epidemiologie und Prognose.....	3
2.1.2 Definition und Ätiologie.....	4
2.1.3 Symptomatik und Diagnostik	5
2.1.4 Klassifikation und Prognosefaktoren	6
2.1.5 Therapie	7
2.2 Epigenetik in der Kanzerogenese	9
2.3 Lysin-Demethylasen (KDM) und ihre Inhibitoren.....	10
2.3.1 Funktion und Einteilung der KDMs	10
2.3.2 KDM und Tumorgenese	11
2.3.2.1 KDM-Isoformen	12
2.3.3 Inhibitoren der KDMs	14
2.3.3.1 KDM1A-Inhibitor SP2509	15
2.4 Zytostatika	16
2.4.1 Etoposid.....	16
2.4.2 Cytarabin	16
2.5 Zielstellung der Arbeit	17
3 Material und Methoden	19
3.1 Material	19
3.1.1 Geräte	19
3.1.2 Verbrauchsmaterial.....	20
3.1.3 Reagenzien, Medien, Puffer und Kits.....	20
3.1.4 Zelllinien und ihre Nährmedien.....	22
3.1.5. Patientenproben	22

3.2	Methoden	24
3.2.1	Zellbiologische Methoden	24
3.2.1.1	Lagern, Auftauen und Kultivieren der Zellen	24
3.2.1.2	Passagieren der Zellen	24
3.2.1.3	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	25
3.2.1.4	Aussäen der Zellen für funktionelle Versuche	26
3.2.1.5	Wirkstoffapplikation	26
3.2.2	Funktionelle Methoden	28
3.2.2.1	Caspase-3-Aktivitätstest	28
3.2.2.2	Durchflusszytometrische Analyse mittels FACS	30
3.2.3	Molekularbiologische Methoden	33
3.2.3.1	Allgemeine Vorbemerkungen zum Arbeiten mit RNA	33
3.2.3.2	Gewinnung und Präparation der Proben	34
3.2.3.3	Isolierung der RNA	34
3.2.3.4	Photometrische Mengenbestimmung der RNA	35
3.2.3.5	Transkription der RNA in cDNA	35
3.2.3.6	Real-Time RT-PCR mittels TaqMan® Technologie	36
3.2.4	Statistische Auswertung	40
4	Ergebnisse	41
4.1	KDM-Expressionsanalyse	41
4.1.1	KDM-Expression von AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern	41
4.1.2	Korrelation der KDM-Expression mit klinischen Parametern	43
4.2	Zellkulturexperimente an THP-1-Zellen	44
4.2.1	Vorversuche	44
4.2.2	Kombinationsbehandlung mit Etoposid und SP2509	48
4.2.3	Kombinationsbehandlung mit Cytarabin und SP2509	50

4.3	Zellkulturexperimente an KG-1-Zellen	52
4.3.1	Vorversuche.....	52
4.3.2	Kombinationsbehandlung mit Etoposid und SP2509.....	55
4.3.3	Kombinationsbehandlung mit Cytarabin und SP2509	57
4.4	Z-VAD Versuche.....	59
4.5	Expressionsanalyse von p21 bei THP-1-Zellen.....	61
5	Diskussion	6162
5.1.	Expressionsanalyse - KDM1A und KDM6B als potentielle therapeutische Angriffspunkte in pädiatrischer AML	62
5.2	Aktivität des KDM1A-Inhibitors SP2509.....	64
5.3	Wirkung von SP2509 auf die Zytostatikatoxizität	66
5.4	p21-Expression in mit SP2509 behandelten THP-1-Zellen.....	67
5.5	Ausblick.....	68
6	Schlussfolgerung	70
7	Anhang	71
7.1	Tabelle.....	71
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	72
7.3	Tabellenverzeichnis.....	74
7.4	Literaturverzeichnis.....	75
7.5	Danksagung.....	82
7.6	Ehrenwörtliche Erklärung	83

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AMC	1-Amino-4-methylcoumarin
AML	Akute myeloische Leukämie
Ara-C	Arabinosyl-Cytosin = Cytarabin
ATO	Arsentrioxid
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	All-trans-Retininsäure
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
β₂M	β ₂ -Mikroglobulin
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i> (B-Zell Lymphom 2)
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
Caspase	<i>cysteiny aspartic acid protease</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CI	<i>combination index</i> (Kombinationsindex)
cm²	Quadratzentimeter
CR	<i>complete remission</i> (komplette Remission)
Ct	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwert)
CTP	Cytidintriphosphat
CYPs	Cytochrome P450
DiOC6(3)	3'3-Dihexyloxacarbocyaniniodid
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNMTs	DNA-Methyltransferasen
dNTP	<i>deoxynucleoside triphosphates</i> (Desoxyribonukleosidtriphosphate)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EKG	Elektrokardiogramm
ERα	Estrogenrezeptor-α

EZH	<i>enhancer of zeste homolog</i>
FAB	<i>French American British</i> (Französisch-amerikanisch-britisch)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAM	6- Carboxy-Fluorescein
FKS	fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energieübertragung
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
ggf.	gegebenenfalls
Gpt/l	Gigapartikel pro Liter
h	<i>hour</i> (Stunde/n)
HATs	Histon-Acetyltransferasen
HDACs	Histon-Lysin-Deacetylasen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hERG	<i>human Ether-a-go-go Related Gene</i>
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IKZ	Inkubationszeit
ITS	Intensivstation
IZKF	Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung
JMJD	<i>jumonji domain-containing protein</i> (Jumonji-Domänenhaltiges Protein)
KATs	Lysin-Acetyltransferasen
KDM	Lysin-Demethylase
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
KMTs	Lysin-Methyltransferasen
LSC	<i>leukemic stem cell</i> (Leukämie-Stammzellen)
LSD	Lysin spezifische Demethylase
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
MAO	Monoaminoxidase
MDS	Myelodysplastischen Syndrom

mg	Milligramm
min	Minute/n
ml	Milliliter
MLL	<i>mixed lineage leukemia</i>
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MNC	<i>mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen)
MRD	<i>minimal residual disease</i> (Minimale Resterkrankung)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-RNA)
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NTC	<i>not template control</i> (negativ-Kontrollen ohne cDNA)
p	p-Wert
P1/2/3	Population 1/2/3
p21/27/53	Protein 21/27/53
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PI	Propidiumiodid
PTM	<i>post-translational modification</i> (Posttranslationale Proteinmodifikation)
RB1	Retinoblastom-Protein 1
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RPMI	Zellkulturmedium (Entwickelt am <i>Roswell Park Memorial Institut</i>)
RT	Reverse Transkriptase
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCP	Tranylecypromin
U/min	Umdrehungen pro Minute

UK	<i>United Kingdom</i> (Vereinigtes Königreich)
UKJ	Universitätsklinikum Jena
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
ZNS	Zentralnervensystem
$\Delta\psi_m$	mitochondriales Membranpotential
53BP1	p53-bindendes Protein 1

1 Zusammenfassung

Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass epigenetische Dysfunktionen in der Entstehung von hämatopoetischen Malignomen eine wichtige Rolle spielen. Die Entwicklung von antileukämischen Therapeutika, die in epigenetische Mechanismen eingreifen, gewinnt daher zunehmend an Bedeutung. Bisher konzentrierte sich die Forschung dabei hauptsächlich auf die therapeutische Regulierung von DNA-Methyltransferasen und Histon-Deacetylasen und erst ansatzweise auf die in dieser Doktorarbeit untersuchten Lysin-Demethylasen (KDM). KDMs sind eine Gruppe von über 30 Isoenzymen, die sowohl Histone als auch Nicht-Histon-Proteine demethylieren und damit die Transkription und andere Zellaktivitäten erheblich beeinflussen. Eine Reihe von Untersuchungen haben gezeigt, dass bei verschiedenen Krebserkrankungen erhöhte oder verminderte KDM-Expressionen vorliegen, was in einer aberranten Histon-Methylierung resultiert, welche tumorpromovierend wirken kann. Da jedoch verschiedene Tumore ganz individuelle KDM-Expressionsmuster aufweisen, ist es für eine gezielte Modulation notwendig, die jeweils onkologisch kritischen KDM-Isoformen Tumortyp-spezifisch zu identifizieren.

In dieser Dissertation wurde erstmalig die klinische Relevanz von KDMs in kindlicher akuter myeloischer Leukämie (AML) systematisch evaluiert. Dank einer in den vergangenen fünf Jahrzehnten kontinuierlich verbesserten Therapie hat sich die Überlebensrate der AML zwar erheblich gesteigert, jedoch belegen neuste Studien, dass die Therapieoptimierung inzwischen ein Plateau erreicht hat. Um die Sterblichkeit weiter zu senken, ist es also notwendig, die Pathogenese der AML weiter zu verstehen, um die Entwicklung neuartiger Therapien zu ermöglichen. Die epigenetisch wirksamen KDMs stellen in dieser Hinsicht einen vielversprechenden Ansatz dar.

In fünfzig Proben AML-kranker Kinder und acht Proben gesunder Knochenmarkspender wurde das Expressionsmuster zehn ausgewählter KDM-Isoenzyme (KDM1A, KDM2B, KDM3B, KDM4A, KDM4B, KDM4C, KDM5A, KDM5B, KDM6A, KDM6B) mittels Real-Time RT-PCR bestimmt. Diese vergleichende Analyse ergab eine signifikant erhöhte Expression der KDM1A ($p = 0,001$) und eine signifikant niedrigere Expression der KDM6B ($p < 0,001$) in den AML-Proben.

Beide Isoenzyme könnten somit eine Rolle bei der AML-Entstehung spielen und ihre Modulation mittels gezielter Therapeutika eine neue Therapiemöglichkeit darstellen. Um dies zu überprüfen, wurde die Wirkung des KDM1A-Inhibitors SP2509 in den zwei AML-Zelllinien THP-1 und KG-1 untersucht. Es stellte sich heraus, dass SP2509 den Zelltod in beiden Zelllinien induziert und zudem die zytotoxische Wirkung der Zytostatika Cytarabin und Etoposid in THP-1 Zellen verstärkt. Real-Time RT-PCR-Analysen zeigten überdies, dass insbesondere die Kombination von SP2509 und Cytarabin auch die Genexpression moduliert.

Der deutliche Effekt auf THP-1-Zellen ist insofern von besonderer Bedeutung, weil diese Zellen ein mutiertes inaktives Tumor-Suppressor-Gen p53 aufweisen und die Wirkung von SP2509 somit p53-unabhängig ist. AML-Zellen mit mutiertem p53 zeigen häufig ein schlechtes Ansprechen auf Cytarabin. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Kombination von SP2509 und Cytarabin auch in solchen kritischen Fällen wirksam sein kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die KDM1A ein geeignetes Medikamentenziel für die Behandlung der kindlichen AML sein kann und legen eine Grundlage für weitergehende Untersuchungen auf diesem Gebiet.

2 Einleitung

2.1 Akute myeloische Leukämie (AML)

2.1.1 Epidemiologie und Prognose

Akute Leukämien sind die häufigsten hämatologischen Malignome im Kindesalter (Abb. 1), wobei in 20 % der Fälle die seltenere akute myeloische Leukämie (AML) und in 80 % die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) auftritt (Ribeiro 2014).

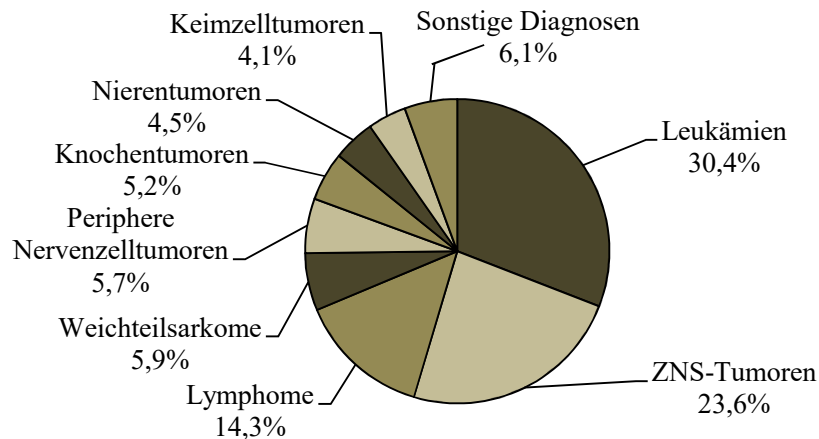


Abb. 1: Relative Häufigkeiten von Krebserkrankungen bei unter 18-jährigen Patienten in Deutschland von 2009 bis 2015

modifiziert nach dem Jahresbericht 2016 des Deutschen Kinderkrebsregisters

Dennoch ist die AML im Kindesalter nicht zu vernachlässigen, da sie eine wesentlich schlechtere Prognose aufweist (Ward et al. 2014). In den letzten 50 Jahren konnte das Langzeitüberleben dank des medizinischen Fortschritts (verbesserte Chemotherapien, Stammzelltransplantationen, Risikostratifizierung und unterstützende Behandlungen) erheblich von < 20 % auf rund 73 % gesteigert werden (Abb. 2) (Rubnitz und Inaba 2012, Kaatsch et al. 2016). Im Vergleich dazu liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei an ALL erkrankten Kindern bei rund 90 % (Siegel et al. 2016). Es ist schwierig, eine einheitliche Prognose anzugeben, da die AML in mehrere genetische Subtypen mit unterschiedlichen Überlebensraten untergliedert werden kann. So muss zwischen prognostisch ungünstigen und günstigen zytogenetischen Veränderungen unterschieden werden und die therapeutischen Möglichkeiten des Behandlungsortes Beachtung finden.

Die aktuelle Inzidenz der kindlichen AML wird auf sieben Fälle pro eine Million Kinder unter 15 Jahren geschätzt ohne signifikanten Geschlechtsunterschied, wobei die meisten Neuerkrankungen laut des Jahresberichtes 2016 des deutschen Kinderkrebsregisters in den ersten zwei Lebensjahren auftreten (Abb. 3) (Creutzig et al. 2012, Kaatsch et al. 2016).

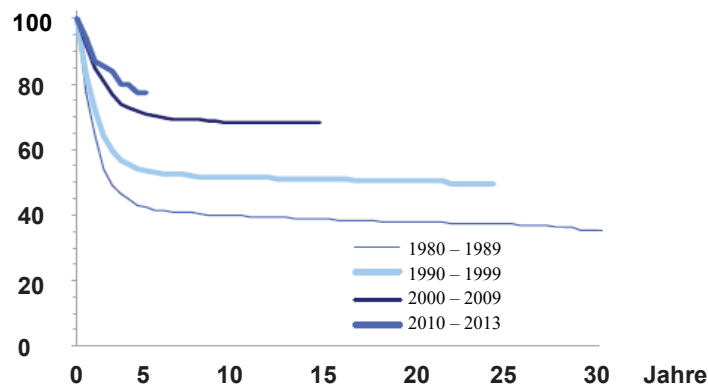


Abb. 2: Überlebenswahrscheinlichkeit von Kindern mit AML in Deutschland von 1980–2013
modifiziert nach dem Jahresbericht 2016 des Deutschen Kinderkrebsregisters

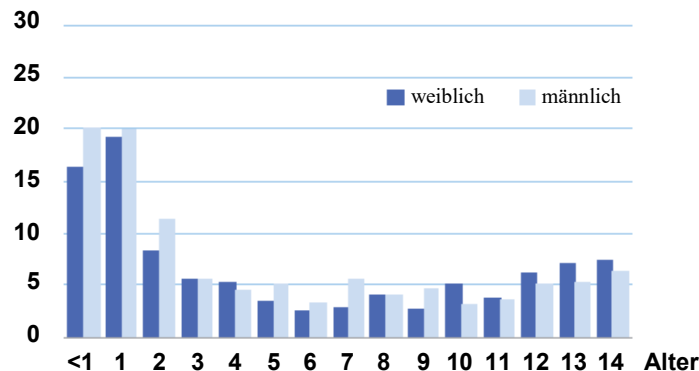


Abb. 3: Alters- und geschlechtsspezifische Inzidenz von AML pro 1 Million Kinder in Deutschland zwischen 2004 – 2013
modifiziert nach dem Jahresbericht 2016 des Deutschen Kinderkrebsregisters

2.1.2 Definition und Ätiologie

Leukämien sind gekennzeichnet durch ein unkontrolliertes Wachstum unreifer hämatopoetischer Vorläuferzellen, sogenannter Blasten, welche die normale Hämatopoese im Knochenmark durch ihre dortige Akkumulation verdrängen und zu einer Knochenmarkinsuffizienz mit Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie führen. Diese Folgen sind bestimmend für die späteren Krankheitssymptome. Weiterhin kann es zu einer Infiltration des peripheren Blutes und extramedullärer Organe kommen. Bei der ALL gehen die Blasten aus lymphozytären Vorläuferzellen hervor, wohingegen sie bei der AML myeloischen Vorläuferzellen entstammen (Creutzig et al. 2013)

Die Entstehung der Leukämien ist bis heute noch nicht ausreichend geklärt. In über 95 % der Fälle liegt bei Kindern eine de-novo Form mit unbekannter Ursache vor und nur ganz selten eine sekundäre Leukämie (Creutzig et al. 2012). Sicher ist, dass

mehrere genetische Veränderungen zusammenkommen müssen, um solch eine Entartung zu verursachen. Zu den verschiedenen prädisponierenden Faktoren zählen Erkrankungen mit chromosomalen Anomalien (Fanconi-Anämie, Neurofibromatose, Bloom- oder Down-Syndrom), Keimbahnmutationen, Immundefekterkrankungen sowie die Exposition mit bestimmten Karzinogenen (ionisierende Strahlung, Benzol, bestimmte Medikamente wie z. B. Procarbazine oder alkylierende Substanzen) (Wiemels 2012, Ward et al. 2014).

2.1.3 Symptomatik und Diagnostik

Allgemeine Symptome sind Fieber, Schweißneigung, Gewichtsverlust, Appetit- und Antriebslosigkeit. Durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese kann es zur Anämie mit Blässe, Müdigkeit und reduzierter körperlicher Belastbarkeit kommen, durch die Granulozytopenie zu gehäuften Infektionen und durch die Thrombozytopenie zu Petechien, Hämatomen und Nasenbluten. Über den Blutstrom infiltrieren leukämische Zellen alle Organe und können zu Hepato- und Splenomegalie, Lymphadenopathie, Knochenschmerzen, Gelenksbeschwerden, Hodenschwellung, Atemnot, Stridor, Gingivahyperplasie und Hautinfiltraten führen. Bei Befall des Zentralnervensystems (ZNS) können Hirnnervenausfälle und Hirndruckzeichen mit Erbrechen, Kopfschmerzen, Lethargie und Papillenödem auftreten. All diese Symptome entwickeln sich meist innerhalb von nur wenigen Wochen (Creutzig et al. 2013).

Meist erfolgt aufgrund des akuten Auftretens der Symptome eine Vorstellung beim Arzt, welcher die Diagnose durch Anamnese, körperliche Untersuchung, eine Knochenmarkuntersuchung mittels Knochenmarkpunktion mit Ausstrich in Verbindung mit einer ausführlichen Laboruntersuchung stellt. Im Blut liegen meist eine normozytäre Anämie mit Retikulozytopenie, eine Thrombo- und eine Neutropenie vor. Die Leukozytenzahl kann sehr variabel sein, von leicht erniedrigt bis stark erhöht. Das Zellbild ist durch die sichtbaren Blasten und den leukämiespezifischen Hiatus leucaemicus (d. h. es fehlen die Zwischenstufen der Myelopoese) sehr monomorph. Eine weitere Besonderheit stellen die sichtbaren Auer-Stäbchen dar. Diese Granulaaggregate sind Ausdruck einer gestörten Granulozytenreifung.

In der Knochenmarkanalyse wird ebenfalls die diffuse Infiltration und Verdrängung sichtbar. Laut AML-Definition muss hier der Anteil der Blasten an allen kernhaltigen Zellen $> 30 \%$ liegen (Creutzig et al. 2012). Zur Unterscheidung der AML von der

ALL und zur Klassifikation der AML erfolgt eine zytologische, -chemische und -genetische Untersuchung des Materials sowie eine Immunphänotypisierung und die Anfertigung einer spezifischen Molekulargenetik. Bei allen Kindern ist eine Liquoruntersuchung zur Beurteilung des ZNS-Befalls notwendig, da die Beteiligung eine spezifische Behandlung erforderlich macht. Nach Diagnosestellung sind weitere Untersuchungen wie ein Röntgen-Thorax, Ultraschall des Abdomens und Herzens, EKG, EEG, ggf. MRT/CT und Skelettszintigraphie zum Ausschluss eines extramedullären Befalls und zur ständigen Überwachung notwendig (Creutzig et al. 2012, Creutzig et al. 2013).

2.1.4 Klassifikation und Prognosefaktoren

Bei der AML handelt es sich um eine heterogene Erkrankung mit verschiedenen Unterformen. Diese unterscheiden sich in ihrem Krankheitsverlauf, der Therapierbarkeit, dem Rezidivrisiko und der Prognose. Deshalb ist eine genaue Klassifizierung und Risikostratifizierung von großer Bedeutung.

Die bekannte FAB-Klassifikation, welche die AML je nach morphologischer Herkunft der leukämischen Zellen (M0 - M3 = myeloisch, vier unterschiedliche Reifestadien, M4 - M5 = monozytär, M6 = erythrozytär und M7 = megakaryozytär) in acht Gruppen untergliedert, wird heute zusehends von der Klassifizierung der Weltgesundheitsorganisation (WHO), die auch den Karyotyp und molekulare Aberrationen berücksichtigt, ersetzt. Beide Klassifikationen sind sowohl für Erwachsene wie auch für Kinder gültig, obwohl bestimmte nur bei Kindern auftretende Translokationen keine Berücksichtigung finden (De Rooij et al. 2015).

Mit Hilfe von prognostischen Faktoren wird versucht, das individuelle Risiko für ein Therapieversagen möglichst früh zu ermitteln. Als günstige prognostische Faktoren bei der AML in allen Altersgruppen gelten bestimmte Karyotypen wie t(8;21), t(15;17) und inv(16), spezielle FAB-Subtypen (M1, M2 mit Auer-Stäbchen, M3 und M4Eo), Down-Syndrom, ein frühes Therapieansprechen und keine ZNS- oder extramedulläre Beteiligung. AML mit komplexen Aberrationen, Deletion von Chromosom 7 oder 5, Hyperleukozytose und mit den FAB-Subtypen M0, M4, M6 und M7 gehen dagegen eher mit einer ungünstigen Prognose einher (Creutzig et al. 1999).

2.1.5 Therapie

Patienten werden entsprechend ihrer Risikogruppe mit unterschiedlichen Zytostatika im Sinne einer Polychemotherapie behandelt. So lassen sich Resistenzbildungen gegen einzelne Substanzen verhindern und wirkstoffspezifische Nebenwirkungen verringern (Pui et al. 2011).

Das Behandlungskonzept besteht aus den Phasen der Induktions- und Konsolidierungstherapie. Gegebenenfalls folgt eine Re-Induktions- oder Erhaltungstherapie. Parallel sollten gezielte Supportivmaßnahmen zum Einsatz kommen, um die Komplikationen, Nebenwirkungen und Spätfolgen so gering wie möglich zu halten. Der Patient befindet sich in einem maximal immunsupprimierten Zustand, deshalb ist besonders auf Hygiene und Infektionsprophylaxe zu achten (Creutzig et al. 2013). Die Behandlung bei Kindern sollte risikoadaptiert erfolgen, besonders in Bezug auf biologische Faktoren, um eine Übertherapie bei Patienten mit günstiger Prognose zu vermeiden und die Ergebnisse bei Kindern mit schlechter Prognose zu verbessern (Creutzig et al. 2012).

Ziel der gesamten Behandlung ist das Erreichen einer dauerhaften, kompletten Remission (CR) durch das Herbeiführen einer schweren, langanhaltenden Knochenmarkaplasie. Laut CR-Definition müssen die Blasten im Knochenmark bei AML $< 5\%$ liegen, es dürfen keine Auer-Stäbchen mehr sichtbar sein und keine extramedulläre Beteiligung vorliegen. Außerdem müssen die Thrombozyten $> 80 \times 10^9/L$ und die Neutrophilen $> 1,0 \times 10^9/L$ liegen (Creutzig et al. 2012). Bei etwa zwei Drittel der Patienten wird eine Remission vier bis sechs Wochen nach Beginn der Induktionstherapie erreicht. Die Überprüfung erfolgt anhand einer Knochenmarkpunktion und als Indikator für das Therapieansprechen dient die molekulargenetische Ermittlung der Minimalen Resterkrankung (MRD) (Rubnitz et al. 2010).

Mit der Induktionstherapie sollte so früh wie möglich nach Diagnosestellung begonnen werden, da bereits eine Verzögerung von fünf Tagen den Behandlungserfolg bei Kindern mit AML verschlechtert (Sekeres et al. 2009). Ziel dieser Phase ist die Blastenreduktion und im besten Falle das Erreichen einer CR. Die Induktion ist das effektivste, intensivste und nebenwirkungsreichste Therapieelement. Zum Einsatz kommen je nach Subtyp, Alter und angewandtem Studienprotokoll Zytostatika wie Cytarabin, die Anthrazykline Daunorubicin, Idarubicin oder Mitoxantron, außerdem Etoposid, All-trans-Retininsäure, Arsentrioxid und weitere. Die Standard-

Induktionstherapie besteht aus der dreitägigen Gabe eines Anthrazyklins und der sieben- bis zehntägigen Cytarabin-Gabe. Empfohlen werden ein bis zwei Durchgänge (Creutzig et al. 2012).

Für die anschließende Konsolidierungstherapie kommen laut der meisten pädiatrischen Therapieoptimierungsstudien zwei bis fünf Kurse Chemotherapie (ähnlich der Induktionstherapie, meist hochdosiertes Cytarabin) infrage oder eine Stammzelltransplantation (autogen oder allogene), um die Remission zu wahren und ein Rezidiv zu verhindern (Creutzig et al. 2012).

Sollten weiterhin Tumorzellen nachweisbar sein, wird die Induktionstherapie wiederholt. Die Notwendigkeit einer anschließenden Erhaltungstherapie ist umstritten und je nach AML-Typ und Studienprotokoll unterschiedlich (Creutzig et al. 2013).

Bei Beteiligung des zentralen Nervensystems erfolgt eine intrathekale Behandlung mit Cytarabin, Methotrexat oder einer Kombination dieser Substanzen mit Hydrocortison. Die optimale Behandlungsanzahl ist dabei bisher unbekannt. Die früher häufig durchgeführte prophylaktische ZNS-Bestrahlung wird heute nur noch bei manifestem initialem ZNS-Befall empfohlen, da das Risiko für spätere, sekundäre maligne Erkrankungen bei Kindern zu hoch ist (Creutzig et al. 2012).

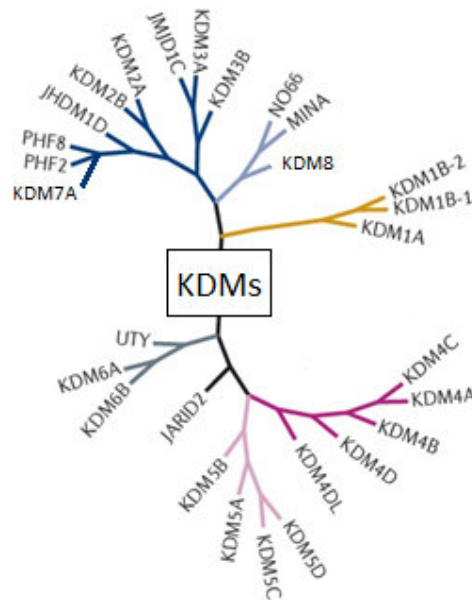
Trotz all der Fortschritte im letzten Jahrzehnt, sterben immer noch ~ 30 % der an AML erkrankten Kinder, bei 30 % tritt ein Rezidiv auf, 5 % leiden unter einer therapieresistenten AML und 5 - 10 % der Kinder sterben an den Komplikationen der Krankheit oder der Behandlung (Creutzig et al. 2012, De Rooij et al. 2015). Um diese Zahlen weiter zu senken, ist es notwendig, die Biologie der AML weiter zu verstehen und die Entwicklung neuartiger, zielgerichteter Therapien zu ermöglichen (Rubnitz und Inaba 2012). Der zukünftige Einsatz epigenetischer Wirkstoffe, die nicht wie herkömmliche DNA-schädigende, krebsinitiierende Zytostatika durch Modifizierung von Biomolekülen zur Apoptose führen, sondern welche in die zugrundeliegenden Entstehungsmechanismen eingreifen, stellen einen vielversprechenden Ansatzpunkt dar (Esteller 2008, Jones und Baylin 2007, Taby und Issa 2010).

2.2 Epigenetik in der Kanzerogenese

Conrad Waddington benutzte 1942 erstmalig den Begriff „epigenetics“, um vom Genotypen unabhängige vererbte Veränderungen im zellulären Phänotyp zu beschreiben (Goldberg et al. 2007). Alle Zellen in einem Organismus verfügen über das gleiche genetische Material. Dennoch besitzen die Zellen je nach Gewebe und Organ die Fähigkeit, einzigartige physikalische Eigenschaften und unterschiedliche biologische Funktionen auszuprägen und aufrechtzuerhalten. Dies ist durch vererbte Unterschiede der DNA-Methylierung und posttranslationaler Modifikationen (PTM) von Histonen, die zu unterschiedlichen Genexpressionsmustern führen, möglich (Arrowsmith et al. 2012, Greer und Shi 2012).

Epigenetische Veränderungen sind reversibel und werden durch verschiedene epigenetische Enzyme, wie beispielsweise DNA-Methyltransferasen (DNMTs), Histon-Lysin-Acetyltransferasen (KATs), Histon-Acetyltransferasen (HATs) und -Deacetylasen (HDACs) und Histon-Lysin-Methyltransferasen (KMTs) und -Demethylasen (KDMs), reguliert (Dawson und Kouzarides 2012, Cai et al. 2015). Inzwischen sind mindestens vier verschiedene DNA-Modifikationen (Baylin und Jones 2011) und 16 Klassen von Histon-Modifikationen bekannt (Kouzarides 2007). Sie können somit die zelluläre Genexpression, jedoch nicht die zugrunde liegende DNA-Sequenz, beeinflussen (Dawson und Kouzarides 2012, Arrowsmith et al. 2012). Bisher ging man davon aus, dass ausschließlich Mutationen zur Tumorentstehung führen. Doch auch die epigenetischen Fehlregulierungen spielen in der Pathogenese vieler, vor allem hämatologischer Malignitäten, eine entscheidende Rolle (Chen et al. 2010, Neff und Armstrong 2013, Fong et al. 2014).

Mit geeigneten Medikamenten ist es somit vorstellbar, krebserzeugende epigenetische Mechanismen zu regulieren und Tumoren damit ursächlich zu behandeln (Esteller 2008). Einige vielversprechende Therapeutika zur Behandlung von hämatopoetischen Krebserkrankungen haben bereits eine Zulassung von der US Food and Drug Administration (FDA) erhalten. Dazu gehören die DNMT-Inhibitoren Azacytidin und Decitabine für die Behandlung der AML bzw. des myelodysplastischen Syndroms und die HDAC-Inhibitoren Vorinostat, Romidepsin, Belinostat und Panobinostat für die Therapie des kutanen/peripheren T-Zell-Lymphoms bzw. des Multiplen Myeloms (Taby und Issa 2010, Cai et al. 2015). Weitere Untersuchungen ergaben, dass HDACs in kindlichen AML- und ALL-Proben



KDMs werden auf der Basis der Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenzen gruppiert und enger verwandte KDMs gemeinsam auf einem farblichen Zweig dargestellt (modifiziert nach Arrowsmith et al. 2012).

Die zweite und größere Klasse wird als Jumonji- oder JmJC-Familie bezeichnet. Sie umfasst derzeit 30 Isoenzyme, von denen 20 nachweislich eine Lysin-Demethylase-Aktivität aufweisen (Kooistra und Helin 2012). Als Gemeinsamkeit besitzen alle eine JmJC-Domäne und werden je nach Anwesenheit anderer Domänen weiter unterteilt. Die JmJC-Familie verwendet eine Fe(II)- und α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase-Reaktion für die Demethylierung von mono-, di- und trimethylierten Lysinresten (Abb. 5) (Kooistra und Helin 2012, Dawson und Kouzarides 2012).

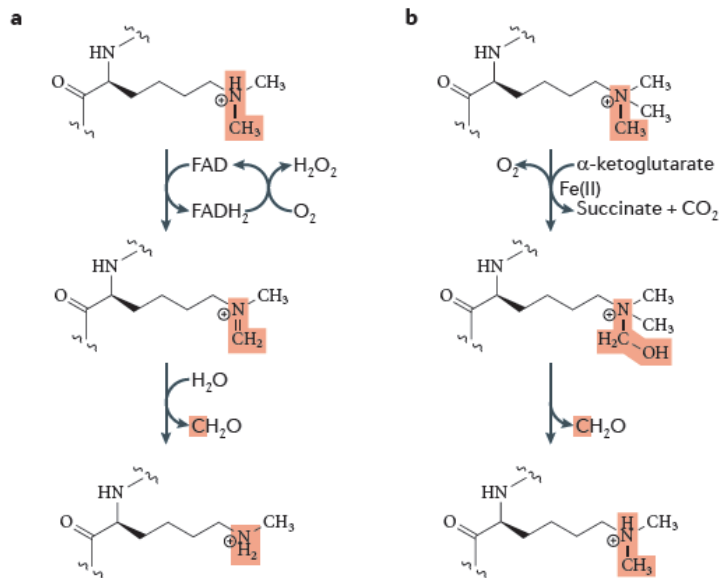


Abb. 5: Reaktionsmechanismen der zwei unterschiedlichen KDM Familien
a = KDM1-Familie, b = Jumonji C-Familie (aus Kooistra und Helin 2012)

Momentan ist die Nomenklatur der KDMs noch sehr uneinheitlich, sodass einzelne Enzyme bis zu vier verschiedene Bezeichnungen in der Literatur haben (Greer und Shi, 2012). In dieser Arbeit wird ausschließlich die Bezeichnung „KDM“ verwendet.

2.3.2 KDM und Tumorgenese

Bei Forschungen an den KDMs hat sich herausgestellt, dass bei verschiedenen Krebserkrankungen erhöhte oder verminderte Expressionen vorliegen. Obwohl es sich bei Krebs grundsätzlich um eine genetische Krankheit handelt, die durch irreversible genomische Mutationen angetrieben wird mit anschließender Onkogenaktivierung oder Tumorsuppressorgeninaktivierung, gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass aus der Fehlregulierung der KDMs eine aberrante Methylierung der Histone resultiert, welche wiederum tumorpromovierend wirken kann. Auch die Demethylierung von Nicht-Histon-Proteinen wie p53, RB1 und STAT3 spielt in der menschlichen Tumorentstehung eine Rolle (Tian et al. 2013). Eine Fehlexpression konnte bereits bei verschiedensten Tumoren nachgewiesen werden (siehe 2.3.2.1).

2.3.2.1 KDM-Isoformen

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die folgenden zehn für die AML relevant erscheinenden KDMs untersucht:

KDM1A demethyliert an Histon (H) 3 mono- (me1) und dimethyliertes (me2) Lysin (K) 4 (H3K4me1/2) und wahrscheinlich auch 9 (H3K9me1/2). Es katalysiert weiterhin die Demethylierung von Nicht-Histon-Proteinen wie dem Tumorsuppressor p53, STAT3 und DNMT1 (Huang et al. 2007, Tian et al. 2013). KDM1A ist in mehreren malignen Erkrankungen hochreguliert und mit einer verminderten Differenzierung, einem aggressiven Tumorwachstum und einer schlechten Prognose assoziiert (Theisen et al. 2014). Eine Überexpression beim Prostatakarzinom, undifferenzierten malignen Neuroblastom, Östrogen-Rezeptor-negativem Mammakarzinom, kolorektalen Karzinom, Blasen- und Lungenkarzinom sowie eine Herunterregulierung beim Mammakarzinom sind bereits bekannt (Højfeldt et al. 2013). Die KDM1A wird zudem nicht nur mit der Krebsentstehung in Verbindung gebracht, sondern auch mit der Entwicklung des Nervensystems (Maes et al. 2015).

Diese spezifische Demethylase weist strukturelle Ähnlichkeiten, vor allem in ihrer katalytischen Domäne, mit der Monoaminoxidase (MAO)-A und -B auf, welche für die Oxidation von Dopamin und Serotonin im menschlichen Körper zuständig sind (Højfeldt et al. 2013).

Bei der pädiatrischen Leukämie zeigten Wada et al., dass die Überexpression von KDM1A die Entwicklung der T-Zellen ALL fördert und Harris et al., dass die KDM1A als wesentlicher Regulator des Leukämie-Stammzellen-(LSC-)Potenzials agiert und in MLL-AF9-Leukämiezellen die Expression des onkogenen Programmes erhält. Durch eine Inhibierung von KDM1A kann genau dieses Potential gehemmt und so ein therapeutischer Effekt erzeugt werden (Harris et al. 2012). Als spezifische Inhibitoren kommen hauptsächlich irreversible MAO-Hemmer wie Tranylcypromin (TCP), Rasagilin oder von ihnen abgeleitete Verbindungen (ORY-1001, GSK2879552) zum Einsatz. MAO-Hemmer inhibieren die MAOs irreversibel durch eine Bindung des Kofaktors FAD und werden hauptsächlich als Medikamente zur Behandlung verschiedener psychischer Erkrankungen eingesetzt (Maes et al. 2015). ORY-1001 ist der bisher stärkste bekannte KDM1A-Hemmer dieser Gruppe. Zellen mit einer Translokation im MLL-Gen sind besonders empfindlich, jedoch ist die Wirkung nicht auf diese Zellen beschränkt. Neben der geringen Zielselektivität weist dieses hochpotente TCP-Analogon weitere Nachteile wie die z. T. unerwünschte Hemmung

der MAOs und potenzielle Nebenwirkungen auf (Maes et al. 2015, Højfeldt et al. 2013). Es sind auch reversible KDM1A-Inhibitoren in der Literatur beschrieben, so z. B. das Benzohydrazid SP2509 und das trizyklische Pyridin GSK690. Diese Substanzen weisen jedoch eine schwächere Potenz auf (Maes et al. 2015). Fiskus et al. zeigten, dass der KDM1A-Inhibitor SP2509 und der HDAC-Inhibitor Panobinostat synergistisch gegen adulte AML-Blasten wirken und Schenk et al. beobachteten, dass die Inhibierung der KDM1A in Kombination mit all-trans-Retinsäure (ATRA) sich bei der Promyelozytenleukämie auf die Differenzierung adulter AML-Blasten auswirkt (Schenk et al. 2012). Es sollte nicht vernachlässigt werden, dass KDM1A auch krebsunterdrückende Aktivität haben kann. In Glioblastomzellen verringert es die Kanzerogenität (Kozono et al. 2015) und bei Brust- und Prostatakrebs verdrängt KDM1A die Metastasen (Wang et al. 2011, Ketscher et al. 2014). Diese unterschiedlichen Beobachtungen zeigen, dass die Hemmung der KDM1A bei einigen Krebsarten nützlich und bei anderen nachteilig sein könnte.

KDM2B demethyliert auf Histon 3 di- und trimethyliertes Lysin 36 (H3K36me_{2/3}) und ist bei verschiedenen Leukämieformen und beim Blasenkarzinom überexprimiert (Maes et al. 2015, Højfeldt et al. 2013).

KDM3B demethyliert H3K9me_{1/2}, aber nicht H3K9me₃. Sie fungiert entweder als Promotor der Leukämogenese oder als potentieller Tumorsuppressor in myeloischen Leukämien (Maes et al. 2015). Bisher sind keine spezifischen Inhibitoren der KDM3-Familie bekannt.

Die **KDM4**-Familie besteht aus fünf Mitgliedern, die vor allem H3K9me_{2/3} oder H3K36me₃ demethylieren (Maes et al. 2015). Die **KDM4A** ist beim Blasenkarzinom unterexprimiert und beim Mammakarzinom überexprimiert (Højfeldt et al. 2013). Bei Plattenepithelkarzinomen ist die Expressionshöhe eine Determinante für die Invasivität und Metastasierung (Maes et al. 2015). **KDM4B** ist beim malignen peripheren Nervenscheidentumor überexprimiert (Højfeldt et al. 2013) und zusammen mit KDM4A als potentieller Progressionsfaktor beim Prostatakrebs anzusehen (Maes et al. 2015). **KDM4C** wird überexprimiert in zahlreichen hämatologischen und soliden Tumoren (Speiseröhrenkrebs, Mammakarzinom und Medulloblastom) (Maes et al. 2015, Højfeldt et al. 2013). In Lymphomen konnte eine Translokation nachgewiesen werden (Højfeldt et al. 2013). SD70, ein 8-Hydroxychinolin Derivat, wurde als KDM4C-Inhibitor durch die chemische Affinität identifiziert (Maes et al. 2015).

Die **KDM5**-Familie demethyliert H3K4me2/3 an der Transkriptionsstartstelle der aktiv transkribierten Gene und stimuliert so die Krebszellproliferation, verringert die Expression von Tumorsuppressoren, fördert die Entwicklung von Resistenzen, das Überleben der tumorinitiierenden Zellen und fördert einen Rückfall (Maes et al. 2015). Die **KDM5A**-Expression im Melanom ist herunterreguliert oder fehlend. Bei akuten Leukämien kann KDM5A transloziert sein und bei Morbus Bechterew mutiert (Højfeldt et al. 2013). **KDM5B** ist assoziiert mit Blasen-, Prostata- und Mammakarzinom bei Überexpression (Højfeldt et al. 2013). EPT-103182 ist der bisher erfolgversprechendste KDM5B-Inhibitor, dessen Struktur noch unbekannt ist und der auch eine Wirkung auf KDM4- und 6-Mitglieder ausübt (Maes et al. 2015).

KDM6A und **KDM6B** demethylieren H3K27me2/3. Mutationen in **KDM6A** wurden mit dem Kabuki-Syndrom in Verbindung gebracht, aber das Gen liegt auch häufig in verschiedenen Tumorarten mutiert vor und scheint so als Tumorsuppressor im kastrationsresistenten Prostatakarzinom, multiplen Myelom, ösophagealen Plattenepithelkarzinom, klarzelligen Nierenzellkarzinom, Übergangszellkarzinom der Blase und in chronischer myelomonozytärer Leukämie, T-ALL und bei myeloiden Malignomen zu wirken. Jedoch ist es auch überexprimiert und mit ungünstiger Prognose beim Mammakarzinom (Maes et al. 2015, Højfeldt et al. 2013). **KDM6B** ist an der Makrophagen-Differenzierung bei Entzündungsreaktionen beteiligt sowie an der Entstehung von Hirnstammgliomen und T-ALL (Maes et al. 2015). KDM6B ist außerdem bei Überexpression assoziiert mit verschiedenen Lungen- und Leberkarzinomen, mit mehreren hämatologisch-malignen Erkrankungen und mit dem primären Hodgkin-Lymphom (Højfeldt et al. 2013). Der Inhibitor GSK-J1 hemmt hauptsächlich KDM6B, zeigt jedoch auch Wirkungen auf KDM6A, KDM5B/C und weist eine eingeschränkte Zellpermeabilität auf. Sein Ethylester GSK-J4 hat eine bessere Eindringfähigkeit und hemmt in der Zelle KDM6B, KDM5B und KDM4C (Maes et al. 2015).

2.3.3 Inhibitoren der KDMs

Mit der Entdeckung der verschiedenen KDMs und der Erforschung der tumorpromovierenden Wirkung durch erhöhte Expressionen mit folgender falscher Regulierung dieser Enzyme und resultierender aberranter Methylierung der Histone und Nicht-Histon-Proteine, begann auch die Suche nach Modulatoren dieser Prozesse. So ergab sich die Frage, ob im Fall aberrant hoher KDM-Expressionen selektive Inhibitoren diese beeinflussen und ob die Inhibierung folglich auch die

Tumorentstehung oder -entwicklung beeinflussen könnte. Die Suche nach KDM-Inhibitoren, die im besten Fall nur eine Isoform hemmen, begann.

Da der Aufbau der katalytischen Domänen der Lysin-Demethylasen weitestgehend bekannt war, zielten die ersten Substanzen auf diese ab (Højfeldt et al. 2013). Die Entwicklung von Inhibitoren der KDM1-Familie zeigte schnell Erfolg, vor allem die KDM1A-Inhibitoren ORY-1001 und GSK2879552 schafften es in Phase-I-Studien, z. B. bei der Behandlung des Multiplen Myeloms (Maes et al. 2015, Højfeldt et al. 2013). Die Entwicklung von wirksamen und selektiven Inhibitoren der großen Jumonji-Familie erwies sich dagegen als komplizierter, da sich die Mitglieder in ihrer Struktur ähneln, wirksame Substanzen eine geringe Zellpenetration aufweisen oder bisher nur in vitro Wirksamkeit zeigten (Maes et al. 2015). So kommt es, dass es immer noch Demethylasen wie die KDM3B gibt, für die aktuell keine selektiven Inhibitoren zur Verfügung stehen oder ausschließlich Pan-Inhibitoren wie JIB-04, IOX-1, NOG und 2,4-PDCA, die mehrere Isoformen beeinflussen. Um eine bessere Substratspezifität und einen besseren Einblick in die Mechanismen der KDMs zu erhalten, ist es in Zukunft notwendig, auch die nicht-katalytischen Domänen dieser Proteine zu erforschen (Højfeldt et al. 2013).

2.3.3.1 KDM1A-Inhibitor SP2509

SP2509 (auch HCI2509) ist ein selektiver, niedermolekularer und reversibler KDM1A-Inhibitor mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) von 13nM, d. h. es werden bei dieser Konzentration 50 % der Enzyme inhibiert. Das Benzohydrazid SP2509 schwächt die Bindung von KDM1A zum Corepressor CoREST, was zu einer erhöhten Methylierung von H3K4 und der Substrate führt sowie zu einer erhöhten Expression von p21, p27 und CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine α in kultivierten AML-Zellen. Im Gegensatz zu den meisten irreversiblen KDM1A-Inhibitoren besitzt es keine Wirkung auf die Monoaminoxidasen A und B, jedoch zeigt sich eine minimale Hemmung von CYPs und hERG (Sorna et al. 2013). Weiterhin konnte bereits eine Hemmung des Koloniewachstums kultivierter AML-Zellen und eine Antitumorwirksamkeit beim dreifach negativen Mammakarzinom, beim schlecht differenzierten Endometriumkarzinom, beim Kolorektal- und Pankreaskarzinom, Ewing-Sarkom und beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom nachgewiesen werden (Fiskus et al. 2014, Theisen et al. 2014, Sorna et al. 2013). Fiskus et al. zeigte ebenfalls, dass der KDM1A-Inhibitor SP2509 und der HDAC-Inhibitor Panobinostat synergistisch tödlich gegen adulte AML-Blasten wirken.

2.4 Zytostatika

2.4.1 Etoposid

Bei Etoposid handelt es sich um ein glycosyliertes, halbsynthetisches Podophyllotoxinderivat. Das Pflanzengift der Wurzel des amerikanischen Maiapfels (*Podophyllum peltatum*) findet seit über 1000 Jahren therapeutisch Anwendung (Slevin 1991). Seit der Mitte des 20. Jahrhunderts ist es als Zytostatikum zur Tumorbehandlung unter anderem beim kleinzelligen Lungenkarzinom, Keimzelltumor, Non-Hodgkin-Lymphom, Kaposi-Sarkom, Weichteilsarkom, Neuroblastom und bei Leukämien unerlässlich (Slevin 1991, Hande 2008). Etoposid hemmt die Topoisomerase II und führt so zur Apoptose durch die Verhinderung der Doppelstrangbruchreparatur während der Chromosomenkondensation und -segregation sowie bei der DNA-Replikation (Hande 2008). Die Topoisomerase II besteht aus mehreren verschiedenen Untereinheiten und fügt unter ATP-Verbrauch in eine intakte DNA-Helix einen vorübergehenden Doppelstrangbruch ein, um die DNA-Topologie zu modulieren und nach dem Strangdurchgang des anliegenden Helix-Teils diesen Bruch zu reparieren (Hande 2008). Häufige Nebenwirkungen können Übelkeit, Erbrechen, Haarausfall, eine Knochenmarkdepression, Überempfindlichkeitsreaktionen mit Fieber und Schüttelfrost, Mukositis, Leberfunktionsstörung und die Induktion einer therapieinduzierten AML sein. Deshalb zählt Etoposid laut WHO zu den karzinogenen Substanzen (Hande 2008).

2.4.2 Cytarabin

Bei Cytarabin, das auch unter dem Namen Arabinosyl-Cytosin oder der Abkürzung Ara-C bekannt ist, handelt es sich um ein chemisches Nukleosidanalogen der Pyrimidinbase Cytosin.

Ara-C wird in die Zellen transportiert und durch verschiedene Kinasen mono-, di- und triphosphoryliert zu Ara-CTP. Dieses wird während der DNA-Replikation anstelle des Desoxycytidintriphosphat (dCTP) eingebaut, was wiederum die Synthese hemmt und so zelltoxisch oder inhibierend auf die Virusvermehrung wirkt (Cohen 1977). Die inhibitorische Aktivität kann durch die Erhöhung oder Aufrechterhaltung der intrazellulären Ara-CTP-Konzentration maximiert werden, weshalb eine hochdosierte Cytarabin-Gabe therapeutisch Anwendung findet (Cohen 1977). Als Antimetabolit-Zytostatikum wird es zur Behandlung vom Myelodysplastischen Syndrom (MDS), des Non-Hodgkin-Lymphom und von akuten Leukämien eingesetzt sowie als

Virostatikum gegen einige DNA-Virusinfektionen (z. B. bei bestimmten Herpes-Viren) (Cohen 1977).

Nebenwirkungen, die auftreten können, sind Mukositis, Übelkeit, Erbrechen, periphere Neuropathie, Leberzellschäden sowie eine Knochenmarkdepression. Bei der Hochdosis-Therapie kann es zu Cerebellitis, Konjunktivitis, Atemnot, Alopezie, Krampfanfällen, Fieber kommen und bei der intrathekalen Gabe zusätzlich zu Arachnoiditis.

2.5 Zielstellung der Arbeit

Die Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. med. Beck im onkologischen Forschungslabor der Kinderklinik des Universitätsklinikums Jena (UKJ) beschäftigt sich schon seit vielen Jahren mit epigenetischen Mechanismen in der Tumorentwicklung. Der aktuelle Schwerpunkt liegt auf der Erforschung von tumorbiologischen Effekten von verschiedenen Histon-Deacetylasen (HDACs) und ihren Inhibitoren (HDACi). Durch die ausführliche Erforschung konnten schon vielfältigste antitumorale Wirkungen bei verschiedenen Krebstypen nachgewiesen werden (Müller und Krämer 2010). So erfolgten auch schon erste Analysen der HDAC-Aktivität bei Blastenpräparationen von 33 pädiatrischen Leukämiepatienten, darunter auch neun AML-Patienten, im Vergleich zu 14 gesunden Knochenmarkspendern. Da auch bei dieser Krebsform eine signifikant erhöhte HDAC-Aktivität festzustellen war, verstärkte die Studie die Überlegung, HDACi in das Therapiekonzept kindlicher Leukämien einzubinden (Sonnemann et al. 2012). Zur Zeit werden Krebspatienten der Jenaer Kinderklinik im Rahmen einer Phase I/II-Studie mit dem HDACi Vorinostat behandelt (Witt et al. 2012).

Die Lysin-Demethylasen besitzen in unterschiedlichen Krebserkrankungen unterschiedliche Expressionsniveaus. Das macht eine Tumortyp-spezifische Untersuchung notwendig. Hinsichtlich Leukämien lagen bisher nur wenige Studien vor. Jüngst hat das Labor mit einer entsprechenden Studie zur systematischen Untersuchung der Bedeutung der KDMs an kindlicher ALL begonnen. Welche Bedeutung die Lysin-Demethylasen und ihre Expressionsmuster bei der Entstehung von kindlicher AML haben, sollte im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit analysiert werden.

Ziel der Arbeit war es, die Expressionshöhen zehn relevant erscheinender KDMs (KDM1A, KDM2B, KDM3B, KDM4A, KDM4B, KDM4C, KDM5A, KDM5B, KDM6A, KDM6B) in 50 AML-Proben auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real-

Time RT-PCR zu ermitteln und mit den Expressionswerten acht gesunder Knochenmarkspender zu vergleichen sowie die klinische Relevanz zu evaluieren.

Aufbauend auf diese Daten sollte im Weiteren eine als potentiell Leukämie-relevant identifizierte KDM funktionell in In-vitro-Versuchen untersucht und beeinflusst werden. Um eine Modulation der gewählten KDM zu überprüfen, sollten einerseits klassische Zytostatika und andererseits ein spezifischer KDM-Inhibitor eingesetzt werden. Im besten Fall war ein synergetischer Effekt zu erwarten. Überprüft werden sollten die Wirkungen des KDM-Inhibitors SP2509 auf die Zytotoxizität von Etoposid sowie Cytarabin in den AML-Zelllinien THP-1 und KG-1.

Die Ergebnisse dieses Projekts könnten die tumorbiologische Bedeutung der KDMs in kindlicher AML erstmalig aufzeigen und eine erste Grundlage für den Einsatz KDM-gerichteter Wirkstoffe zur Behandlung kindlicher AML darstellen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Die aufgeführten Materialien und Chemikalien wurden über die Universitätsapothek Jena oder direkt von den Herstellern bezogen.

3.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Accu-jet Pipette Controller	BrandTech Scientific, Essex, USA
BBD 6220 CO ₂ Brutschrank	Thermo Scientific, Waltham, USA
BD FACS Canto II Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
BioPhotometer plus	Eppendorf, Hamburg
Einfrierautomat TRA-14	Cryoson, Schöllkrippen
Eismaschine	NordCap, Bremen
Fast Real-Time PCR System (7900 HT)	Life Technologies, Darmstadt
FLUOstar Omega, multi-mode microplate reader	BMG Labtech, Ortenberg
Gefrierschrank (-20 °C)	Bosch, München
HERA safe KS 12, Sterilwerkbank	Heraeus Thermo Scientific, Hanau
Inkubator BBD6220 (37 °C; 5 % CO ₂)	Heraeus Thermo Scientific, Hanau
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen Bosch, München
Mikroskope	Carl Zeiss, Jena Leica, Wetzlar
Mikrozentrifuge	Labaratory & Medical Supplies
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer (Improved)	Assistent Germany, Bad Blankenburg
pH Elektrode	Mettler Toledo, Columbus, USA
Pipetten Eppendorf Reference® variabel 0,5-10, 10-100, 50-200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand, Wertheim
Präzisions-Quarzküvette	Hellma, VWR International
Stickstofftank	Messer-Griesheim, Krefeld
Thermal Reactor	Biometra, Göttingen
Vortex-Genie®2	Scientific Industries, New York, USA
Waage	Kern&Sohn, Balingen Sartorius
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zellzähler Counter AC-15	Karl Hecht, Sondheim/Rhön
Zentrifuge Rotanta/TR	Hettich, Bäch, Schweiz

Tab. 1: Allgemein verwendete Geräte

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
BD Falcon™ Rundbodenröhrchen, 5 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Cellstar® Zellkulturplatten 12/96 Well	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Cellstar® Tubes, 15/50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Cellstar® Kulturflasche 5/20 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Cellstar® Serologische Pipette, 1/2/5/10 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Combitips Plus 1,0/2,5/5,0/10,0/25,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Collection Tubes 1,5 /2 ml	Qiagen, Hilden
Deckgläser (plan geschliffene)	Menzel, Braunschweig
Kanülen	BD Biosciences, Heidelberg
Kryoröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Nitrilhandschuhe	Meditrade, Kiefersfelden
Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City, USA
Pasteur-Plastikpipetten, 3 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster Ratiolab, Dreieich
Pipettenspitzen 10/200/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
QIAshredder Spin Säule	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Spin Säule	Qiagen, Hilden
Safe Lock Röhrchen 0,5/1,5 ml	Eppendorf, Hamburg

Tab. 2: Allgemeine Verbrauchsmaterialien

3.1.3 Reagenzien, Medien, Puffer und Kits

Reagenzien, Medien, Puffer und Kits	Hersteller
BD Cytometer Setup & Tracking Beads™	BD Biosciences, Heidelberg
Caspase-3-Substrat (Ac-DEVD-AMC)	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Cytarabin	Cell Pharm, Bad Vilbel (Apotheke)
Descosept AF, Desinfektionsmittel	Dr. Schumacher, Malsfeld
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe
DiOC ₆ (3) (3'3-Dihexyloxacarbocyaniniodid),	Molecular Probes, Eugene, USA
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAA Laboratories
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Etoposid, 50 mM Stammlösung	Ratiopharm, Ulm
FKS (Fetales Kälberserum)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glycerin	Merck, Darmstadt
HCL (Salzsäure)	Carl Roth, Karlsruhe

Reagenzien, Medien, Puffer und Kits	Hersteller
HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Meliseptol® HBV Desinfektionstücher	B. Braun Melsungen
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Mini-Plasco® connect, Aqua ad iniectionabilia	B. Braun Melsungen
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
Na ₄ P ₂ O ₇ (Tetranatriumdiphosphat)	Merck, Darmstadt
Omniscript® RT Kit QIAGEN (10xBuffer-RT, dNTP-Mix, Omniscript-RT)	Qiagen, Hilden
PBS (phosphate buffered saline)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Penicillin G/Streptomycin	Lonza, Köln
pegGOLD DNase I Digest Kit (DNase-Verdau)	Peqlab, Erlangen
PI (Propidiumiodid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Random-Hexamer	Qiagen, Hilden
RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden
RNase OUT™	Invitrogen, Karlsruhe
RNeasy® Mini Kit (250) (RLT-Lyse-Puffer, RW1-Waschpuffer, RPE-Waschpuffer)	Qiagen, Hilden
RPMI-1640 mit stabilem Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
SP2509	Selleck Chemicals, München
TaqMan® Gene Expression Assay (Universal PCR Master Mix, Primer-Sonden-Mix: KDM1A: Hs01002741_m1, KDM2B: Hs00404800_m1, KDM3B: Hs00213240_m1, KDM4A: Hs00206360_m1, KDM4B: Hs00943636_m1, KDM4C: Hs00909579_m1, KDM5A: Hs00231908_m1, KDM5B: Hs00981910_m1, KDM6A: Hs00958902_m1, KDM6B: Hs00996325_g1, p21: Hs00355782_m1, β2M: Hs00187842_m1)	Life Technologies, Darmstadt
Tris-HCl (Tris-Hydrochlorid)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypanblau 0,5 % (w/v) in PBS	Biochrom AG, Berlin
Z-VAD, 20 mM Stammlösung	Apotheke Universitätsklinikum Jena

Tab. 3: Verwendete Reagenzien, Medien, Puffer und Kits

3.1.4 Zelllinien und ihre Nährmedien

Die Zelllinien stammen von der DSMZ, Braunschweig (alle Angaben laut DSMZ).

THP-1 Humane AML-Zelllinie, 1978 aus dem peripheren Blut eines einjährigen Jungen mit AML-Rezidiv gewonnen

Morphologie: runde, vereinzelte Zellen, die in Suspension leben und sich zum Teil gruppieren

Depositor: Dr. J. Minowada, Fujisaki Cell Center, Okayama, Japan, DSMZ ACC 16

Medium: 500 ml RPMI-1640 + 50 ml Fetales Kälberserum (FKS) + 100 units/ml Penicillin G + 0,1 mg/ml Streptomycin

KG-1 Humane AML-Zelllinie, gewonnen aus dem Knochenmark eines 59-jährigen Mannes mit Erythroleukämie, welche sich zu einem AML-Rezidiv entwickelte 1977

Morphologie: runde, vereinzelte Suspensionszellen

Depositor: Dr. H. G. Drexler, DSMZ, Braunschweig, Germany

Medium: 500 ml RPMI-1640 + 100 ml FKS + 100 units/ml Penicillin G + 0,1 mg/ml Streptomycin

3.1.5. Patientenproben

Die Kinderklinik des Universitätsklinikums Jena verfügt über eine umfangreiche Zell- und korrespondierende Datenbank. Dieser Sammlung wurden sowohl die Proben der acht gesunden Knochenmarkspender wie auch der 50 AML-Patienten entnommen. Alle 50 Patienten waren unter 19 Jahre alt und wurden zwischen 1980 und 2013 in der Kinderklinik Jena mit zuvor unbehandelter AML diagnostiziert. Der Altersmedian bei Diagnosestellung betrug 9,32 Jahre, wobei zwei Kinder bereits einen Tag nach Geburt an initialer AML verstarben. Die Diagnosestellung wurde routinemäßig durchgeführt und alle Patientenproben vor dem Beginn der Chemotherapie gewonnen. Alle relevanten Patientendaten wurden von Prof. Dr. Gruhn zur Verfügung gestellt oder den Krankenakten entnommen. Die relevantesten klinischen Parameter sind in der folgenden Tabelle (Tab. 4) aufgelistet.

Die schriftlichen Einwilligungen der Erziehungsberechtigten bzw. der Patienten für den Einsatz aller Patientenproben zu Forschungszwecken liegen vor, wie auch die Genehmigung der Ethikkommission vom Universitätsklinikum Jena (# 4066-04 / 14) für die Durchführung der Studie.

(n = 50)	Anzahl (n)	Prozent (%)	Unbe- kannt (n)
Geschlecht			0
männlich	25	50,0	
weiblich	25	50,0	
Alter in Jahren			0
< 10	26	52,0	
≥ 10	24	48,0	
Initiale Leukozytenzahl (Gpt/l)			7
< 50	15	30,0	
≥ 50	28	65,0	
FAB-Typ			0
M0	1	2,0	
M1	10	20,0	
M2	11	22,0	
M3	0	0,0	
M4	16	32,0	
M5	11	22,0	
M6	0	0,0	
M7	1	2,0	
Karyotyp			5
günstig	10	20,0	
intermediär oder ungünstig	35	70,0	

(n = 50)	Anzahl (n)	Prozent (%)	Unbe- kannt (n)
ZNS-Befall			7
negativ	35	70,0	
positiv	8	16,0	
Auerstäbchen			7
negativ	34	68,0	
positiv	9	18,0	
Komplette Remission (CR)			11
Ja	19	38,0	
Nein	20	40,0	
KMT			1
Keine KMT	35	70,0	
KMT	14	28,0	
Überleben			0
Ja	24	48,0	
Nein	26	52,0	
Therapieprotokoll			4
AML-I/82	12	24,0	
AML-II/87	9	18,0	
AML-BFM 93	8	16,0	
AML-BFM 98	12	24,0	
AML-BFM 04	4	8,0	
AML-BFM 12	1	2,0	

Tab. 4: Übersicht relevanter klinischer Parameter der 50 untersuchten AML-Patienten
(FAB = French-American-British-Klassifikation, KMT=Knochenmark-
transplantation)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

Sämtliche Arbeitsschritte der Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank von Thermo Scientific durchgeführt. Alle Materialien und Geräte wurden vor ihrem Einsatz gereinigt bzw. desinfiziert, sterilisiert oder autoklaviert. Die Inkubation im Brutschrank erfolgte stets bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit.

3.2.1.1 Lagern, Auftauen und Kultivieren der Zellen

Die Zellen der zwei gewählten Leukämie-Zelllinien wurden in 1,5 ml Kryoröhrchen in -196 °C flüssigem Stickstoff aufbewahrt. In jedem Aliquotröhrchen befanden sich eine (KG-1) bzw. fünf (THP-1) Millionen Zellen, gelöst in 70 % RPMI-Medium, 20 % FKS und 5 % DMSO und eingefroren unter Verwendung eines Einfriersystems (Einfrierautomat TRA-14 „intelligent freezing chamber“, Cryoson, Software Biofreeze BV50, Consarctic GmbH), welches die Zellen innerhalb von 50 Minuten stufenweise auf -120 °C kühlt. Sabine Becker hat freundlicherweise das Einfrieren und Lagern der Zellen übernommen.

Zum Ansetzen einer neuen Kultur mussten die kryokonservierten Zellen aus dem Stickstofftank zügig im Wasserbad (37 °C) unter Schwenken erwärmt werden. Die Überführung der aufgetauten Zellsuspension in 15 ml zelllinienspezifisches, vorgewärmtes Medium erfolgte unter der sterilen Werkbank. Das befüllte Röhrchen wurde anschließend bei 1200 U/min für drei Minuten zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen, das übrige Zellpellet in frischem Medium (5 ml bei KG-1, 20 ml bei THP-1) mit einer sterilen Pasteurpipette resuspendiert und in eine unbeschichtete Kulturflasche (25 cm² bei KG-1, 75cm² bei THP-1) überführt. Es folgte die Inkubation im Brutschrank unter täglicher mikroskopischer Kontrolle des Wachstums und der Morphologie der Zellen bis zum Erreichen einer Konfluenz von 85 - 90 % in der Kulturflasche. Ab der dritten Passage wurde auch die Zelllinie KG-1 in einer großen Kulturflasche (75 cm²) angezüchtet.

3.2.1.2 Passagieren der Zellen

Alle drei bis vier Tage, nach Erreichen der Konfluenz, erfolgte das Splitten der Zelllinien. Nach erneuter visueller Kontrolle unter dem Mikroskop und dem Erwärmen des zellspezifischen Mediums im 37 °C warmen Wasserbad kam es mit einer serologischen 10 ml Pipette zur Überführung der alten Kulturflaschensuspension in ein 50 ml Röhrchen. Die 75 cm²-Kulturflasche wurde anschließend mit 10 ml Medium

gespült. Nach leichtem Schwenken, um alle Suspensionszellen abzulösen, wurden auch diese 10 ml in das 50 ml Röhrchen pipettiert. Es folgte die Zentrifugierung des gefüllten 50 ml Röhrchen für drei Minuten bei 1200 U/min. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 30 ml (KG-1) bzw. 20 ml (THP-1) frischem Medium gelöst und mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette solange resuspendiert, bis eine homogene Suspension entstand. Aus dieser Suspension mussten 20 µl für die Zellzahlbestimmung entnommen und die Zellzahl wie unter 3.2.1.3 beschrieben, ermittelt werden.

Um die Zelllinien weiter zu kultivieren, wurden die neuen Kulturflaschen (meist zwei Passagen pro Flasche) mit der gewünschten Zelldichte angelegt. Beim Passagieren der KG-1- Linie wurden stets 20×10^6 Zellen eingesät, bei THP-1 für 3 Tage 7×10^6 Zellen und bei 4 Tagen 5×10^6 Zellen. Diese gewünschte Zellzahl musste durch die ermittelte Zellzahl (siehe 3.2.1.3) dividiert werden, um das benötigte Volumen für eine 75 cm²-Kulturflasche zu errechnen. Das Zellsuspensionsvolumen musste wiederum vom Gesamtvolumen 20 ml abgezogen werden, um das Restvolumen zu erhalten, welches in Form von Komplettmedium vorgelegt wurde. Die neue Zellkultur wurde im Inkubator bis zum erneuten Passagieren aufbewahrt.

3.2.1.3 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Zur quantitativen Zellzahlbestimmung wurden in einem Eppendorf-Röhrchen 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl des Vitalfarbstoff Trypanblau gemischt (d. h. Verdünnungsfaktor = 2) und kurz gevortext. Davon wurden 20 µl aufgenommen um die Neubauer-Zählkammer zu befüllen und um anschließend lichtmikroskopisch in zwei der vier Quadranten Zellen mit Hilfe des Zellzählers „Counter AC-15“ auszuzählen. Ein Quadrant besitzt ein Volumen von 0,1 µl (Länge 1 mm x Breite 1 mm x Höhe 0,1 mm) und besteht aus 16 Kleinquadranten.

Der saure Farbstoff Trypanblau lagert sich nur in Zellen mit geschädigter Zellmembran ein. So lassen sich bei der Zählung die toten blauen Zellen von den vitalen ungefärbten Zellen im Mikroskop unterscheiden. Die vitale Zellzahl pro Milliliter ergibt sich aus folgender Rechnung:

$$\text{vitale Zellen pro 1 ml Zellsuspension} = \frac{\text{gezählte lebende Zellzahl pro 1 ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der Großquadrate}}$$

Weiterhin wird die Vitalität angegeben:

$$\text{Vitalität in \%} = \frac{\text{lebende Zellzahl}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100 \%$$

3.2.1.4 Aussäen der Zellen für funktionelle Versuche

Im Anschluss an die Zellzahlbestimmung erfolgte die Berechnung der für die funktionellen Tests benötigten Volumina bei Einsatz von 12-Well Platten. Für die durchflusszytometrische FACS-Analyse wurden pro Well 150.000 Zellen und bei der Caspase-3-Aktivitätsbestimmung 200.000 Zellen benötigt. Daraus ergab sich folgende Berechnung:

$$\frac{\text{benötigtes Volumen}}{\text{Volumen}} = \frac{\text{notwendiges Volumen (Wellanzahl} \times 150.000 \text{ bzw. } 200.000 \text{ Zellen)}}{\text{gezählte Zellzahl pro 1 ml}}$$

Die berechnete Menge wurde aus der Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen pipettiert. In diesem war bereits die Menge an RPMI-Medium vorgelegt, das für ein Endvolumen von 1 ml pro Well benötigt wurde. Mit Hilfe einer Multipette wurden pro Well 1 ml der fertigen Verdünnung ausgesät und wie gewohnt im Brutschrank für 24 Stunden inkubiert.

3.2.1.5 Wirkstoffapplikation

Vor den Behandlungen erfolgte eine mikroskopische Überprüfung der Adhärenz und Dichte des Zellrasens. Die Applikation erfolgte unter sterilen Bedingungen und bei gedämpftem Licht, da einige Substanzen eine Photosensibilität aufwiesen. 24 Stunden nach der Aussaat der Zellen erfolgte die erste Vorbehandlung der entsprechenden Wells mit dem Pancaspase-Inhibitor Z-VAD-fmk oder dem Nekroptose-Inhibitor Necrostatin-1. Die zweite Vorbehandlung fand nach einer Stunde mit dem spezifischen KDM1A-Inhibitor SP2509 statt. Nach Applikation dessen folgte eine vierstündige Inkubationszeit im Brutschrank, bevor es zur eigentlichen Zytostatikabehandlung mit Etoposid oder Cytarabin kam. Alle Konzentrationsreihen wurden zuvor mit den Verdünnungsmitteln RPMI-Medium oder DMSO angelegt, wie in Tab. 5 aufgeführt. Im Anschluss an die Zytostatikabehandlung wurden die Zellen entweder für 24 Stunden zur Caspase-3-Aktivitätsbestimmung oder für 48 Stunden zur anschließenden durchflusszytometrischen PI/DiOC₆(3)-Messung im Brutschrank inkubiert.

Wirkstoff	Wirkstoffklasse	Art der Behandlung	Stamm-lösung	Verdünnungs-mittel	Konzentrationen [µM]	IKZ
Z-VAD - fmk	Pancaspase-Inhibitor	Vorbe-handlung	20 mM	RPMI-1640	KG-1: 20 THP-1: 20	1 h
SP2509	KDM1A-Inhibitor	Vorbe-handlung	1 mM	DMSO, RPMI-1640	THP-1: 0,75/ 1 KG-1: 1/ 1,5	4 h
Etoposid	Zytostatikum: Topoisomerase II-Hemmer	Hauptbe-handlung	50 mM	RPMI-1640 - Komplett-medium	THP-1: 0,1/ 0,15/ 0,2/ 0,25/ 0,3/ 0,4 KG-1: 0,5/ 1/ 2/ 5/ 10	24 h/ 48 h
Cytarabin	Zytostatikum: Antimetabolit	Hauptbe-handlung	2 mM		THP-1: 0,05/ 0,1/ 0,2/ 0,5/ 1 KG-1: 0,2/ 0,5/ 1/ 2/ 5	24 h/ 48 h

Tab. 5: Eingesetzte Wirkstoffe und ihre Eigenschaften

Die Konzentrationen sowie die optimalen Inkubationszeiten wurden durch eigene Dosis-Wirkungs-Vorversuche sowie durch Erfahrungswerte des onkologischen Forschungslabors unter der Leitung von Dr. J. Sonnemann bestimmt, IKZ = Inkubationszeit, richtet sich nach Art der Untersuchung, bei Caspase-3Aktivitätsmessung 24 h, bei FACS-Analyse 48 h

3.2.2 Funktionelle Methoden

3.2.2.1 Caspase-3-Aktivitätstest

Grundlage: Caspasen (engl.: cysteine aspartate-specific proteases) sind Cysteinproteasen, welche Proteine am c-terminalen Ende von Aspartat spalten. Sie sind ein wichtiger Bestandteil der Signalkaskade, die zum programmierten Zelltod, der Apoptose, führt. Eine Inhibierung dieser Proteasen führt in-vivo und in vitro zu einer Apoptosehemmung. Alle Caspasen werden als Proenzyme synthetisiert und müssen über verschiedenste Wege aktiviert werden. Es gibt Caspasen mit großen N-terminalen Prodomains (Caspase -1, -2, -4, -5, -8, -9, -10), die als Initiatoren einen regulierenden Einfluss auf ihre Aktivierung haben, während die Caspasen mit kurzen Prodomains (Caspase -3, -6, -7) als Effektoren für die Ausführung der Apoptose zuständig sind (Wolf und Green 1999).

Caspase-3 nimmt eine zentrale Rolle in der Apoptose ein und kann über mehrere Wege (im intrinsischen Apoptoseweg durch Caspase-9; im extrinsischen Weg durch die Caspase-8) aktiviert werden (Creagh et al. 2003). Die Caspase-3 weist eine Vielzahl an Substraten im Zytoplasma, Zellkern und Zytoskelett auf, welche hinter dem Asparaginsäure-Rest der Tetrapeptid-Erkennungssequenz (DEVD=Asp-Glu-Val-Asp) gespalten werden (Porter und Janicke 1999).

Durch das synthetische Caspase-3-Substrat (Ac-DEVD-AMC) ist es möglich, ihre Aktivität im Fluoreszenzphotometer zu bestimmen. AMC (1-Amino-4-methylcoumarin) ist ein fluorogenes Molekül, welches von der Caspase-3 abgespalten wird. Es emittiert mit einer Wellenlänge von 460 nm und hat eine Anregungswellenlänge von 355 nm. Die gemessene Fluoreszenz ist somit ein effektiver Indikator für den apoptotischen Zelltod.

Durchführung: Die zu untersuchende Zelllinie wurde in 12-Well Kulturplatten ausgesät, wie unter 3.2.1.4 beschrieben. Je Well wurden 200.000 Zellen benötigt, welche einen Tag später je nach Versuch vor- und behandelt wurden. Anschließend folgte die 24-stündige Inkubation. Zum Ernten der Zellen wurde zuerst PBS im Wasserbad erwärmt, die Zentrifuge auf 4 °C gekühlt und aus jedem Well das Medium mit einer Einwegpasteurpipette in ein entsprechendes 15 ml Röhrchen pipettiert. Alle Well wurden anschließend dreimal mit 1 ml PBS gespült. Vor dem Zentrifugieren bei 1800 U/min für fünf Minuten wurde das Röhrchen auf 13 ml mit PBS aufgefüllt. Nach dem vollständigen Verwerfen des Überstandes folgte das 15-minütige Lysieren des Zellsediments mit 100 µl Caspase-3-Lysepuffer.

Reagenz	Konzentration	Volumen
NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ (pH 7,5)	20 mM	25 ml
Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM	5 ml
NaCl	1 M	6,5 ml
Na ₄ P ₂ O ₇	100 mM	5 ml
Triton-X 100	100 %	0,5 ml
Destilliertes Wasser		ca. 8 ml
HCL	9 %	ca. 100 µl <i>bis pH bei 7,5!</i>
Insgesamt		50,00 ml

Tab. 6: Caspase-3-Lysepuffer für 50 ml

Das Ansetzen des Caspase-3-Lysepuffer übernahm freundlicherweise Sabine Becker. Die auf Eis gestellten, lysierten Proben wurden mit je 110 µl frisch hergestelltem Caspase-3-Aktivitätspuffer vermischt und anschließend möglichst lichtgeschützt und vollständig (210 µl) in ein Well einer 96-Well-Multititerplatte pipettiert.

Reagenz	Konzentration	Volumen
HEPES	1 M	0,02 ml
Glycerin	100 %	0,1 ml
Destilliertes Wasser		0,828 ml
DTT	1 M	0,002 ml
Caspase-3-Substrat (<i>photosensibel!</i>)	50 µg/ml	0,05 ml
Insgesamt	für ca. 7 Proben + Überschuss	1,00 ml

Tab. 7: Caspase-3-Aktivitätspuffer für 1 ml

Das erste Well jeder benötigten Spalte wurde mit destilliertem Wasser, das Zweite ausschließlich mit 100 µl Lysepuffer und 110 µl Caspase-3-Aktivitätspuffer (= Leerwert) befüllt. Diese Messungen waren nötig, um die Eigenfluoreszenz der Substrate zu ermitteln und später abzuziehen. Die fertig befüllte Platte wurde verschlossen und mit Alufolie umwickelt für zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Messung erfolgte bei 355/460 nm an einem Fluoreszenzphotometer, von welchem die entpackte und geöffnete 96-Well Platte analysiert wurde.

Auswertung: Von den ermittelten Fluoreszenzen wurde der Mittelwert der Leerwerte subtrahiert. Die weitere Bestimmung der relativen Caspase-3-Aktivität ging von der unbehandelten Probe aus und wurde als Vielfaches dessen mit Hilfe von Microsoft Excel berechnet.

3.2.2.2 Durchflusszytometrische Analyse mittels FACS

Grundlage: Bei der Durchflusszytometrie werden die in einem laminaren Flüssigkeitsstrom transportierten Partikel und Zellen von einem Laser bestrahlt, gemessen und hinsichtlich ihrer Größe, relativen Fluoreszenzintensität, Granularität oder internen Komplexität analysiert. Ein optischelektronisches System erfasst dabei die Lichtstreuung, also die Ablenkung des einfallenden Lichtstrahls (Tyndall-Effekt). Es muss das Vorwärtstreulicht (FSC, forward Scatter) vom Seitwärtstreulicht (SSC, Side Scatter) unterschieden werden. Das Vorwärtstreulicht ist proportional zur relativen Zellgröße und -oberfläche, da jedes Partikel ein volumenabhängiges FSC-Signal erzeugt. Aufschluss über die Zellgranularität gibt das SSC-Signal, das durch die Messung des gebrochenen und reflektierten Laserstrahls entsteht.

Weiterhin können auch mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Zellen mit dem FACS-System (Fluorescence Activated Cell Sorting) quantitativ analysiert werden. Der monochromatische Laserstrahl hebt die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes bei exakter Anregung auf ein höheres Energieniveau. Anschließend nehmen die Elektronen wieder ihren Grundzustand ein, geben dabei jedoch die überschüssige Energie in Form von Photonen ab (= Fluoreszenz). Die Fluoreszenzintensität, die durch einen Photodetektor registriert und in elektronische Signale transformiert wird, ist proportional zur Menge an gebundenen Fluorochromen.

Fluorochrome	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Farbe	Nachweis
PI (Propidium-iodid)	540 nm	608 nm	orange-rot	Zelltod
DiOC ₆ (3) (3'3-Di-hexyloxacarbo-cyaniniodid)	482 nm	504 nm	grün	mitochondriales Membranpotential

Tab. 8: Eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Eigenschaften

Der Zelltod wurde durch die durchflusszytometrische Bestimmung der Integrität der Zellmembran mittels Propidiumiodidaufnahme bestimmt. Das Molekül kann nur perforierte Zellmembranen toter Zellen überwinden und interkaliert stöchiometrisch in doppelsträngige DNA. So kann man PI-positive tote Zellen von PI-negativen vitalen Zellen unterscheiden (Riccardi und Nicoletti 2006). Weiterhin wurde durch die DiOC₆(3) Anhäufung in der inneren Mitochondrienmembran der Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\psi_m$) bestimmt. Eine vitale Zelle zeigt eine Anfärbung mit diesem Farbstoff, die vom FACS erfasst werden kann. Eine

apoptotische Zelle, bei der es zur Permeabilisierung der mitochondrialen Membran und zum Abfall des $\Delta\psi_m$ kommt, zeigt keine Anfärbung mit DiOC₆(3) (Loeffler und Kroemer 2000). Der Anteil ungefärbter Zellen wird in % von der Gesamtzellzahl angegeben.

Durchführung: Für die FACS-Analysen wurden pro Well 150.000 Zellen in 12-Well Kulturplatten ausgesät (siehe 3.2.1.4), nach 24 Stunden Inkubation mit SP2509 vorbehandelt, nach vier Stunden mit Zytostatika (Etoposid oder Cytarabin) behandelt (siehe 3.2.1.5), nach weiteren 48 Stunden im Brutschrank mit jeweils 2 µl/Well DiOC₆(3) (Endkonzentration: 50 nM) beimpft und nach 30 Minuten bei 37 °C geerntet. Vor dem Ernten war es erforderlich, PBS im 37 °C Wasserbad zu erwärmen und den Arbeitsplatz vorzubereiten. Das Zellmedium jedes einzelnen Wells wurde mittels Einwegpasteurpipette in ein 4 ml FACS-Röhrchen überführt. Die Platten wurden anschließend mit je 1 ml PBS gewaschen und die gefüllten FACS-Röhrchen für fünf Minuten bei 1800 U/min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das restliche Zellpellet auf Eis gestellt. Zu diesem Pellet wurden 500 µl PBS pipettiert und solange resuspendiert, bis die Flüssigkeit homogen erschien.

Am BD FACSCanto™ II fand direkt nach dem Einschalten die Gerätekalibrierung mittels BD Cytometer Setup & Tracking Beads™ (CST-Beads) statt, gefolgt von der Kompensationsmessung. Diese ist vor der Versuchsmessung notwendig, um bei gleichzeitiger Messung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe Messfehler durch eine Signaldetektion im anderen Fluorochromkanal oder eine Interferenz der Wellenlängenbereiche zu verhindern (Jaroszeski und Radcliff 1999). Für die Kompensation wurden je 150.000 Zellen in drei zusätzlichen Wells (Negativkontrolle, nur PI, nur DiOC₆(3)) am ersten Tag des Versuches ausgesät, unbehandelt mitgeführt und normal geerntet. Nur das DiOC₆(3)-Well wurde eine halbe Stunde vor dem Ernten mit 2 µl DiOC₆(3) beimpft. Kurz vor der Messung wurde in das dritte Kompensationsröhrchen 55 µl 0,5 % iges Triton X-100 pipettiert, um alle Zellen abzutöten und anschließend mit 1 µl PI (Endkonzentration: 2 µg/ml) anzufärben. Um die Eigenfluoreszenz der Zellen und Medienreste auszugleichen, wurde die Negativkontrolle ohne Farbstoffzusatz mitgeführt.

Im Anschluss an die Kompensationsmessung wurden 20 Sekunden vor der Messung zu jeder Probe 1 µl PI hinzugefügt und kurz gevortext.

Auswertung: Mit dem Programm BD FACSDiva (BD Bioscience, Heidelberg, 2000) wurden die gewonnenen Daten analysiert. Die Darstellung der gemessenen Daten erfolgte in drei Dot Plots und zwei Histogrammen. Bei den Dot Plots handelt es sich um zweidimensionale Punktwolkendarstellungen, bei denen auf der X-Achse das Signal des FSC (=Zellgröße) gegenüber dem Signal des SSC (= Zellgranularität) oder eines Fluorochroms (PI oder DiOC₆(3)) auf der Y-Achse dargestellt wurden (Abb. 6). Jede Punktwolke entspricht einer gemessenen Zellpopulation und jeder dargestellte Punkt einem gemessenen Ereignis. Um Verunreinigungen, Zelltrümmer oder noch nicht vereinzelte Zellen auszugrenzen, wurden sogenannte Gates gesetzt und die gemessene Ereigniszahl des FSC auf einen Schwellenwert von 10.000 begrenzt. In der weiteren Auswertung wurde nur die erwünschte gefensterte Population 1 (P1) betrachtet.

Bei den Histogrammen wurden die Signale eines Fluorochroms (PI oder DiOC₆(3)) auf der X-Achse gegenüber der Zellzahl aufgetragen (Abb. 7).

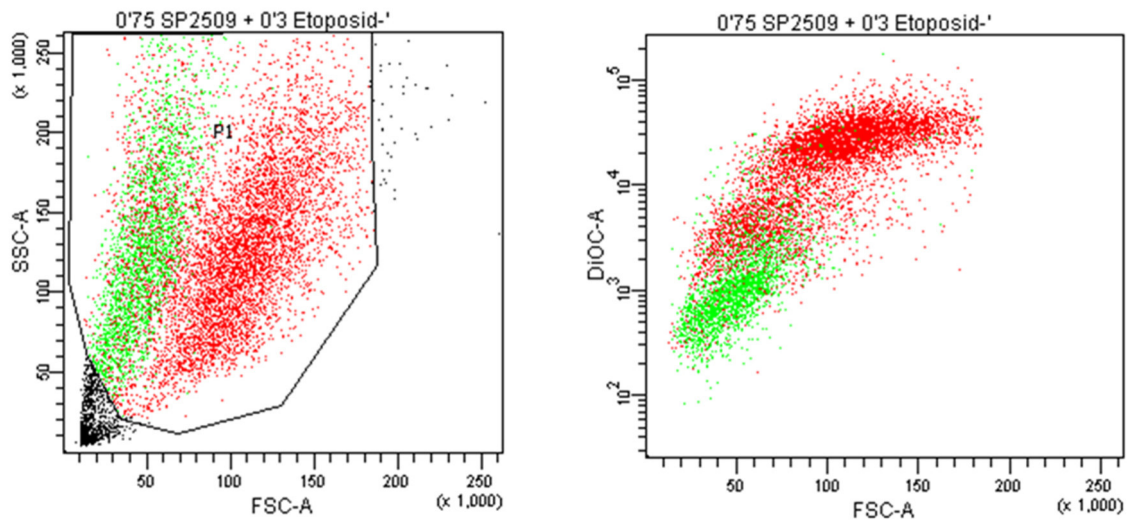


Abb. 6: Dot Plots der THP-1 Zellen mit abgegrenzter Population 1 (P1)
nach Behandlung mit 0,75 μ M SP2509 und 0,3 μ M Etoposid

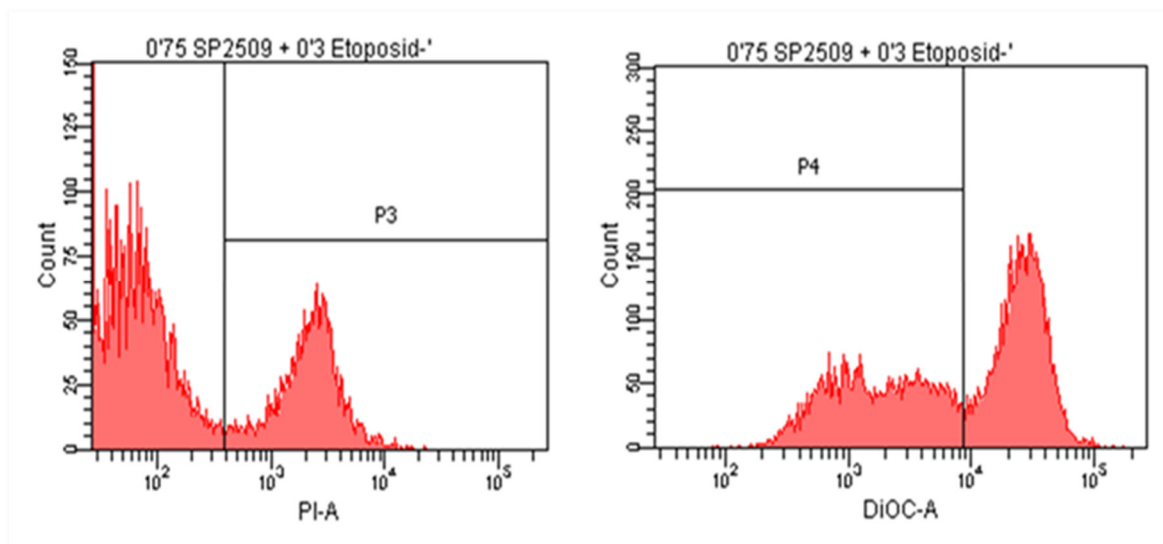


Abb. 7: Histogramme der THP-1 Zellen

Behandlung mit 0,75 μ M SP2509 und 0,3 μ M Etoposid, Zelltodanalyse (links) durch Ermittlung der PI-positiven, toten Zellen (P3), Messung des mitochondrialen Membranpotentials (rechts) durch Ermittlung der DiOC₆(3)-negativen, apoptotischen Zellen (P4)

Die Zelltodergebnisse aus den Kombinationsexperimenten wurden hinsichtlich ihres Synergismus/Antagonismus und durch die Kombinationsindex (CI)-Isobologramm-Methode nach Chou und Talalay unter Verwendung „CalcuSyn“ Software von Biosoft (Cambridge, UK) analysiert. Kombinationsindex-Werte (CI) gleich 1 zeigen eine additive Wirkung, CI > 1 einen Antagonismus und Werte < 1 einen Synergismus in den Wirkstoffkombinationen auf.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Allgemeine Vorbemerkungen zum Arbeiten mit RNA

Um eine Genexpressionsanalyse der Patientenproben mittels quantitativer "Real-Time"-Polymerasekettenreaktion (PCR) durchführen zu können, war es zunächst erforderlich, die AML-Proben zu gewinnen, Leukämiezellen zu präparieren, die gesamte RNA zu isolieren, photometrisch zu bestimmen und in cDNA zu transkribieren. Im Gegensatz zu DNA ist RNA sehr empfindlich. Für die Untersuchungen ist ein hoher Reinheitsgrad der RNA von entscheidender Bedeutung. Das setzt ein besonders sauberes Arbeiten voraus. Deshalb wurden während des Arbeitsprozesses generell Einmalhandschuhe aus Nitril getragen, sterile wattierte Pipettenspitzen, sterile Reaktionsgefäße und steriles RNase-freies Wasser benutzt. Es wurde bei +4 °C gearbeitet und zentrifugiert. Die Laborbank und die zu verwendenden Laborgegenstände wurden zuvor gereinigt und desinfiziert.

3.2.3.2 Gewinnung und Präparation der Proben

Die Leukämie-Zellen und die mononuklearen Zellen der acht gesunden Spender wurden aus dem Knochenmark oder peripherem Blut durch Ficoll-Paque Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Nach diesem Verfahren betrug die Fraktion an Leukämie-Zellen mehr als 90 % in allen AML-Proben. Mit dem Knochenmark-Ausstrichpräparat, welches mit May-Grünwald-Giemsa gefärbt wurde, erfolgte die genauere zytologische Beurteilung. Die Langzeitaufbewahrung der Blasten in 70 % RPMI-Medium, 20 % FKS und 5 % DMSO erfolgte in Stickstofftanks in -180 °C flüssigem Stickstoff.

Alle Proben wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Gruhn gewonnen, präpariert und mir im Rahmen meiner Dissertationsforschungen zur Verfügung gestellt.

3.2.3.3 Isolierung der RNA

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (250) von Qiagen® und dem peqGold Total RNA Kit von Peqlab.

1. Homogenisieren und Lyse: Die Proben im Kryoröhrchen mussten unter Schwenkbewegungen im Wasserbad bei 37 °C schnell erhitzt werden, um sie danach im aufgetauten Zustand in ein 15 ml Röhrchen mit 10 ml PBS-Puffer zu überführen. Es folgte das Waschen dieser Zellsuspension für fünf Minuten bei 1500 U/min in der auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 350 µl bzw. 600 µl (je nach Größe des Zellpellets) RLT-Puffer mit enthaltenem 1 % β-Mercaptoethanol resuspendiert. Das Lysat wurde auf die QIAshredder Spin Säule gegeben, welche in einem 2 ml Collection Röhrchen steckte, und für zwei Minuten bei 13.200 U/min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert.

2. Bindung der RNA: Die Säule wurde verworfen und der Durchfluss mit identischem Volumen an 70 % Ethanol versetzt und vorsichtig gemischt, bis eine homogene Flüssigkeit entstand. Die gesamte Probe wurde anschließend auf eine RNeasy Mini Spin Säule pipettiert, welche wiederum auf einem 2 ml Collection Röhrchen steckte. Auch diese Säule mit Röhrchen musste kurz für 15 Sekunden anzentrifugiert werden. Dabei konnte die RNA an die Silikamembran binden und die Flüssigkeit im Sammelgefäß anschließend verworfen werden.

3. Waschen: Auf jede Säule wurden 350 µl RW1-Waschpuffer gegeben. Nach fünf Minuten Einwirkzeit und 15-sekündigem Zentrifugieren konnte der Säulendurchfluss verworfen werden. Um die verbliebene DNA zu entfernen, folgte der DNase-Verdau mit 75 µl. Zuvor wurde der DNase I Reaktionsmix von peqGold Total RNA Kit

vorbereitet, bestehend aus 73,5 µl DNase I Digestionspuffer und 1,5 µl RNase-freier DNase. Dieser Mix musste direkt auf die Membran pipettiert werden und bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubieren. Es folgte weiteres Waschen mit 350 µl RW1-Waschpuffer bzw. zweimal mit 500 µl RPE-Waschpuffer. Nach jedem Waschen wurde die Säule wieder anzentrifugiert bei 13.200 U/min und das Unterröhrchen erneut geleert.

4. *Trocknen*: Die RNeasy Mini Spin Säule im geleerten Collection Tube wurde durch zweiminütiges Zentrifugieren vollständig getrocknet, der Unterstand mit Tube verworfen und die Säule auf ein sauberes 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gesteckt.

5. *Elution*: Zur Elution der RNA von der Säule wurden 35 - 60 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Matrix pipettiert und jeweils eine Minute inkubiert und zentrifugiert. Die Säulen konnten danach verworfen und die Röhrchen auf Eis gestellt werden.

3.2.3.4 Photometrische Mengenbestimmung der RNA

Die RNA-Konzentrationen wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem BioPhotometer plus von Eppendorf gemessen. Die Reinheit der RNA-Proben wurde über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm bestimmt und sollte bei reiner RNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Zu kleine Werte deuten auf eine Verunreinigung hin. Für die Messungen mussten 4 µl der RNA auf 76 µl RNase-freies Wasser pipettiert werden, um die für die Messung in der Quarzküvette benötigten 80 µl Volumen zu erhalten. Als Leerwert-Kontrolle dienten 80 µl RNase-freies Wasser.

Die **RNA-Konzentration (µg/µl)** einer Probe berechnete sich wie folgt:

$$\frac{\text{Absorption}_{260\text{nm}} \times 40 \text{ µg RNA/ml (Absorptionseinheit für RNA)} \times 20 \text{ (Verdünnungsfaktor)}}{1000 \text{ (Umrechnung von ml in µl)}}$$

Die isolierte RNA wurde im Anschluss entweder bei -20 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

3.2.3.5 Transkription der RNA in cDNA

Nachdem die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt wurde, konnte die benötigte µl-Menge von 0,5 µg Endkonzentration für die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) berechnet und in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Für den Ansatz der cDNA-Transkription mit Omniscript® RT Kit von QIAGEN wurde ein Volumen von 20 µl benötigt. Subtrahiert mit der

berechneten Menge an RNA in μl und 7 μl an Reverse Transkriptase (RT)-Mix ergab sich die variable Restmenge an RNase-freiem Wasser. Der RT-Mix wurde folgendermaßen pro Probe angesetzt:

Reagenz	Volumen
10x Buffer-Reverse Transkriptase	2 μl
dNTP-Mix	2 μl
Random-Hexamer	2 μl
RNase-Inhibitor	0,25 μl
Omniscript-Reverse Transkriptase	1 μl
Insgesamt	7,25 μl

Tab. 9: Transkriptionsreagenzien, 7,25 μl pro Probe

Zuerst wurde das berechnete Wasser, danach die RNA und der RT-Mix in ein 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Die reverse Transkription konnte anschließend im 37 °C vorgeheizten Heizblock in der darauffolgenden Stunde stattfinden. Die entstandene einzelsträngige cDNA wurde für die PCR verdünnt (1:2 mit RNase-freiem Wasser) und benutzt oder bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.3.6 Real-Time RT-PCR mittels TaqMan® Technologie

Grundlage: Die Methode der Polymerase Kettenreaktion (PCR), eine der inzwischen wichtigsten und am weitesten verbreiteten Techniken der Molekularbiologie, ermöglicht die enzymatische Herstellung von millionenfachen Kopien bestimmter Nukleotidsequenzen. Auch kleinste Mengen DNA oder cDNA können so in kurzer Zeit in-vitro vervielfältigt werden. Die klassische PCR besteht aus den drei Schritten Denaturierung (Trennung der DNA Doppelstränge bei 95 °C), Annealing (Primerhybridisierung an DNA bei primerspezifischer Temperatur) und Elongation (komplementäre DNA-Strangsynthese durch die DNA-Polymerase bei polymerasespezifischer Temperatur). Durch eine erneute Erwärmung werden die entstandenen DNA-Doppelstränge wieder getrennt, sodass die Vervielfältigung der DNA durch erneute Anlagerung der Primer fortgeführt werden kann. Bei jedem der 40 Zyklen wird die Zahl der zur Verfügung stehenden Vorlagen somit verdoppelt. Dieser schnelle und reibungslose Ablauf wurde erst nach der Entdeckung der hitzestabilen *Thermus aquaticus* (taq)-Polymerase möglich. Alle Schritte werden

vollautomatisch in einem programmierbaren Heizblock, einem so genannten Thermocycler, durchlaufen.

Die TaqMan® Methode verwendet zusätzlich zu den beiden Primer der klassischen PCR eine fluoreszenzmarkierte Sonde, die 1993 von Lee et al. entwickelt wurde. Diese Sonde besteht aus einem sequenzspezifischem Oligonukleotid, das am 5'-Ende der Sonde mit einem Fluoreszenzreporterfarbstoff (z. B. FAM = 6-Carboxy-Fluorescein) und am 3'-Ende der Sonde mit einem Quencherfarbstoff (z. B. TAMRA = 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin) markiert ist. Wird die intakte Sonde bei ihrer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird das Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch die Fluoreszenz-Resonanz-Energieübertragung (FRET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit der amplifizierten DNA-Sequenz und die 5' - 3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase spaltet hydrolytisch die Sonde (Holland et al. 1991). Als Resultat wird das Fluorophor vom Quencher entfernt und durch den unterbrochenen Energietransfer ein Anstieg der sequenzspezifischen Reporterfluoreszenz detektiert (Ginzinger 2002). Die Zunahme der Fluoreszenz ist proportional zur amplifizierten PCR-Sequenz und kann daher für die Quantifizierung des Transkripts und zur Untersuchung des Expressionsverhalten einiger Gene benutzt werden.

Die Real-Time PCR kombiniert somit zwei Geräte: einen Thermocycler zur DNA Amplifikation (PCR) und ein optisches Detektionsmodul zur Messung und Quantifizierung der entstehenden Fluoreszenz in Echtzeit. Das Ganze kann in einem einzigen Reaktionsgefäß vom Ansatz bis zur Auswertung gemessen werden und bietet so eine erhöhte Zeitersparnis durch das Wegfallen der Agarose-Gelelektrophorese (Bustin 2002).

Durchführung: Alle Reagenzien und Proben wurden nach dem Auftauen oder vor dem Öffnen und nach dem Pipettieren gevortext und anzentrifugiert. Zuerst wurden alle AML- und Spender-Proben 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt, um 50 µl Ausgangsmaterial für die gesamte Messreihe zur Verfügung zu haben.

Am Anfang jeder Messung musste der Sondenmix für jede Probe (25 µl) sowohl für das Ziel-Gen als auch für das Referenz-Gen in einem 2 ml Eppendorf-Röhrchen wie folgt hergestellt und gevortext werden:

Reagenz	Volumen
Destilliertes Wasser	11,25 µl
Universal PCR Mastermix	12,5 µl
Primer-Sonden-Mix (= <i>Gene Expression Assays</i>)	1,25 µl
Insgesamt	<u>25,00 µl</u>

Tab. 10: PCR Reagenzien, 25 µl pro Probe

Der Primer-Sonden-Mix enthält die für die zu untersuchende Sequenz spezifischen Primer und die fluoreszenzmarkierte Sonde (FAM für alle KDMs, VIC für β_2M). Im Mastermix ist die AmpliTaq Gold DNA-Polymerase enthalten für die Sonden Hydrolyse.

Mit einer Multipette wurden je 50 µl des Mixes in 61 (50 Patientenproben + 8 Spenderproben + 2 KM-Pools + 1 Negativkontrolle) kleine 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Hinzu kamen je 2 µl der entsprechenden cDNA. Die Negativkontrolle (NTC, not template control) enthielt den Mastermix ohne cDNA. Anschließend wurde der gesamte Inhalt auf zwei 96-Well-Platten pipettiert (je 25 µl pro Well, immer zwei Well pro Probe für die Doppelbestimmung). Die quantitative Real-Time RT-PCR erfolgte mit dem 7900 HT Fast Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystem sowie der Software SDS 2.2.2. nach Herstellerangaben.

Auswertung: Das Real-Time System erzeugt aus den ermittelten Fluoreszenzwerten ein Amplifikationsplot, in welchem die detektierten Fluoreszenzintensitäten (ΔRN) auf der Ordinate gegen die Zyklusanzahl auf der Abzisse dargestellt werden (Abb. 8). Der Fluoreszenzwert startet nicht bei null, da die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe bereits eine gewisse Grundfluoreszenz aufweisen und auch die verwendeten Materialien (z. B. die 96-Well Platte) eine Hintergrundfluoreszenz (engl.: baseline) erzeugen. Im Bereich der Baseline kommt es zwar bereits zur Produktsynthese, die entstehenden Produktmengen sind jedoch noch zu gering für den folgenden linearen Fluoreszenzanstieg. Im Anstieg wird bei etwa zehnfachem Signalniveau gegenüber der baseline eine Schwelle (engl.: threshold) gelegt. Der Threshold stellt eine Trennlinie zur Unterscheidung zwischen signifikanter Zunahme der Fluoreszenz und der Hintergrundfluoreszenz dar. Der Schnittpunkt zwischen ihm und dem Amplifikationsgraph wird als Cycle-threshold (Ct) bezeichnet und markiert einen Anstieg der Fluoreszenz über den Schwellenwert.

Je niedriger der Ct-Wert, d. h. je eher sich das Fluoreszenzsignal von der Hintergrundstrahlung abhebt, desto mehr Kopien der Zielsequenz sind in der entsprechenden Probe vorhanden. Die Ct-Werte sind entscheidend für die weitere RNA-Quantifizierung (Ginzinger 2002).

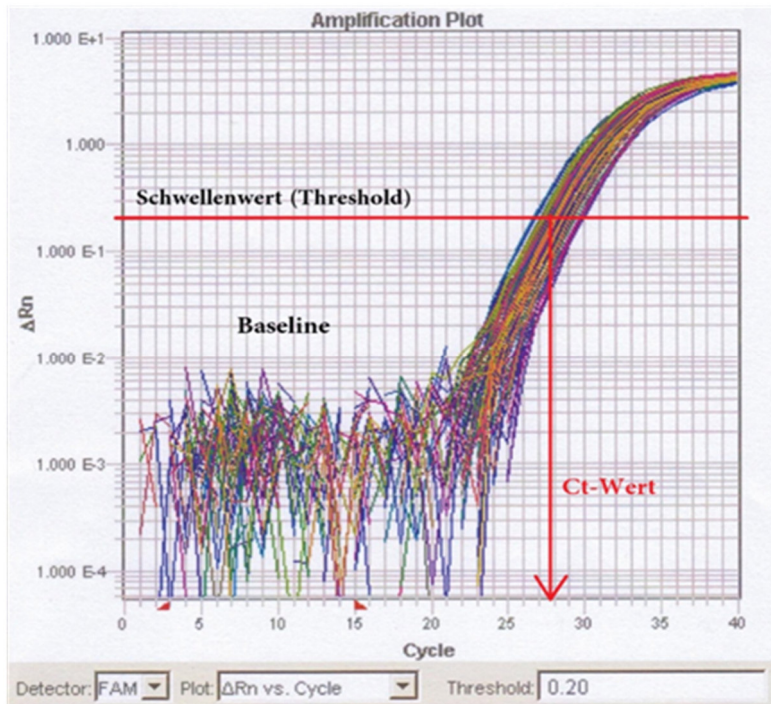


Abb. 8: PCR-Amplifikationsplot

Bei der relativen Quantifizierung findet ein Mengenvergleich zwischen der RNA-Menge in der zu untersuchenden Probe und der RNA-Menge in einer bekannten Referenzprobe mittels der 2001 von Livak und Schmittgen publizierten $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ -Methode statt. Zur Normalisierung der Expressionslevel wurde das Referenzgen β_2 -Mikroglobulin (β_2M) für jede Probe amplifiziert. Als Referenzgene (housekeeping genes) bezeichnet man Gene, die zum Überleben der Zellen notwendig sind und daher konstant exprimiert werden. Das für meine Arbeit benutzte β_2M ist ein Polypeptid, das in Klasse-I-Proteinen des Haupthisto-kompatibilitätskomplex (MHC, major histocompatibility complex) vorkommt. Aus den Ct-Werten beider Messungen konnte der ΔCt -Wert für die untersuchten KDMs berechnet werden. Zur weiteren Evaluierung der 50 AML-Patientenproben wurden acht gesunde Knochenmark-Spender-Proben gepoolt und auf jeder 96-Well Platte mit untersucht. Aus der Differenz ließ sich der $\Delta\Delta Ct$ -Wert errechnen. Die Bestimmung der relativen Genexpressionen erfolgte anschließend durch das Einsetzen der Werte in die Formel $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, um den

Expressionsunterschied zwischen beiden Gruppen zu ermitteln (Livak und Schmittgen 2001, Ginzinger 2002).

$$\begin{aligned}\Delta\text{Ct Zielsequenz (KDMs)} &= \text{Ct Zielgen (KDM)} - \text{Ct Referenzgen (\beta 2M)} \\ \Delta\text{Ct Kontrolle (KM-Pool)} &= \text{Ct Kontrolle (KM-Pool)} - \text{Ct Referenzgen (\beta 2M)} \\ \Delta\Delta\text{Ct} &= \Delta\text{Ct Zielsequenz (KDMs)} - \Delta\text{Ct Kontrolle (KM-Pool)} \\ \text{Ratio} &= 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}\end{aligned}$$

Aus den $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ -Daten der Doppelbestimmungen wurden Mittelwerte gebildet und als Bezugswerte wurden die Knochenmark-Pool-Angaben gleich 1 gesetzt.

3.2.4 Statistische Auswertung

Zur Auswertung wurden das Programm „Microsoft Office Excel 2007“, das IBM Statistikprogramm „SPSS Statistics 22.0“ für Windows und das Analyse- und Darstellungsprogramm „Origin 2015“ verwendet. Mit SPSS erfolgte die statistische Analyse der Korrelation der unterschiedlichen KDM-Expressionswerte mit verschiedenen klinischen Parametern sowie die Prüfung auf Signifikanz und die Auswertung der Expressionsdaten von p21. Die Expression der zehn KDM-Isoenzyme in unterschiedlichen Patientengruppen wurde im Falle von zwei Gruppen nach dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test, im Falle von mehr als zwei Gruppen nach dem Kruskal-Wallis-Test verglichen. Zur Reduktion der Wahrscheinlichkeit einen Fehler 1. Art zu begehen, wurde das Signifikanzniveau nach Holm-Bonferroni-Korrektur bestimmt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert $<0,05$ festgelegt.

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Mario Walther vom Institut für Medizinische Statistik Jena.

4 Ergebnisse

4.1 KDM-Expressionsanalyse

4.1.1 KDM-Expression von AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern

Für die quantitative Expressionsbestimmung wurden zehn KDMs gewählt, die bereits mit verschiedensten Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht wurden. Von diesen zehn Enzymen gehört eines (KDM1A) zu der LSD-Familie und die anderen neun (KDM2B, KDM3B, KDM4A, KDM4B, KDM4C, KDM5A, KDM5B, KDM6A und KDM6B) zu der JmJC-Gruppe (siehe 2.3.1). Die relative mRNA-Expressionsanalyse dieser KDMs erfolgte durch die Real-Time RT-PCR in 50 kindlichen AML-Proben und acht Knochenmarkproben von gesunden Spendern (siehe 3.2.3.5). Die Expressionsniveaus wurden auf die $\beta 2$ -Mikroglobulinwerten normalisiert und der Pool aus den gesunden KM-Proben wurde gleich 1 gesetzt als Referenz.

Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen wurde durch den Mann-Whitney-Test bewertet und die p-Werte wurden für mehrere Tests mit der Bonferroni-Methode korrigiert. Es zeigte sich, dass das Expressionsniveau der KDM1A in den untersuchten Krebszellen im Vergleich zu den Spenderproben signifikant erhöht ($p = 0,001$) und bei KDM6B verringert ($p < 0,001$) war (Tab. 11 und Abb. 9). Bei fünf anderen KDMs (KDM2B, KDM4A, KDM4C, KDM5B und KDM6A) zeigte sich ein Trend zu höheren Expressionen und bei den restlichen Drei (KDM3B, KDM4B und KDM5A) ein Trend zu niedrigeren Expressionen in den AML-Proben.

	Gesunde Knochenmarkspender (n: 8)		AML-Patienten (n: 50)		
Gen	Median	Q1-Q3*	Median	Q1-Q3*	p-Wert**
<i>KDM1A</i>	1,48	1,04-1,92	3,62	2,09-5,83	0,001
<i>KDM2B</i>	1,31	0,65-2,20	1,48	0,95-2,08	0,735
<i>KDM3B</i>	1,15	0,81-2,14	0,88	0,68-1,12	0,075
<i>KDM4A</i>	1,21	0,51-1,42	2,31	1,30-3,33	0,029
<i>KDM4B</i>	1,41	1,03-2,21	0,71	0,26-1,26	0,019
<i>KDM4C</i>	1,40	0,86-1,74	2,00	1,32-2,73	0,079
<i>KDM5A</i>	0,91	0,74-1,93	0,64	0,44-0,92	0,011
<i>KDM5B</i>	0,99	0,81-1,86	1,72	0,83-3,15	0,344
<i>KDM6A</i>	1,07	0,48-1,75	1,33	0,90-2,21	0,104
<i>KDM6B</i>	1,37	0,56- 3,04	0,22	0,15-0,30	<0,001

Tab. 11: KDM-Expressionen der gesunden Knochenmarkspender und AML-Patienten

* Q1 - unteres Quartil, Q3 - oberes Quartil. ** Berechnet mittels Mann-Whitney-Test;

Rot: statistisch signifikant nach Holm-Bonferroni-Korrektur.

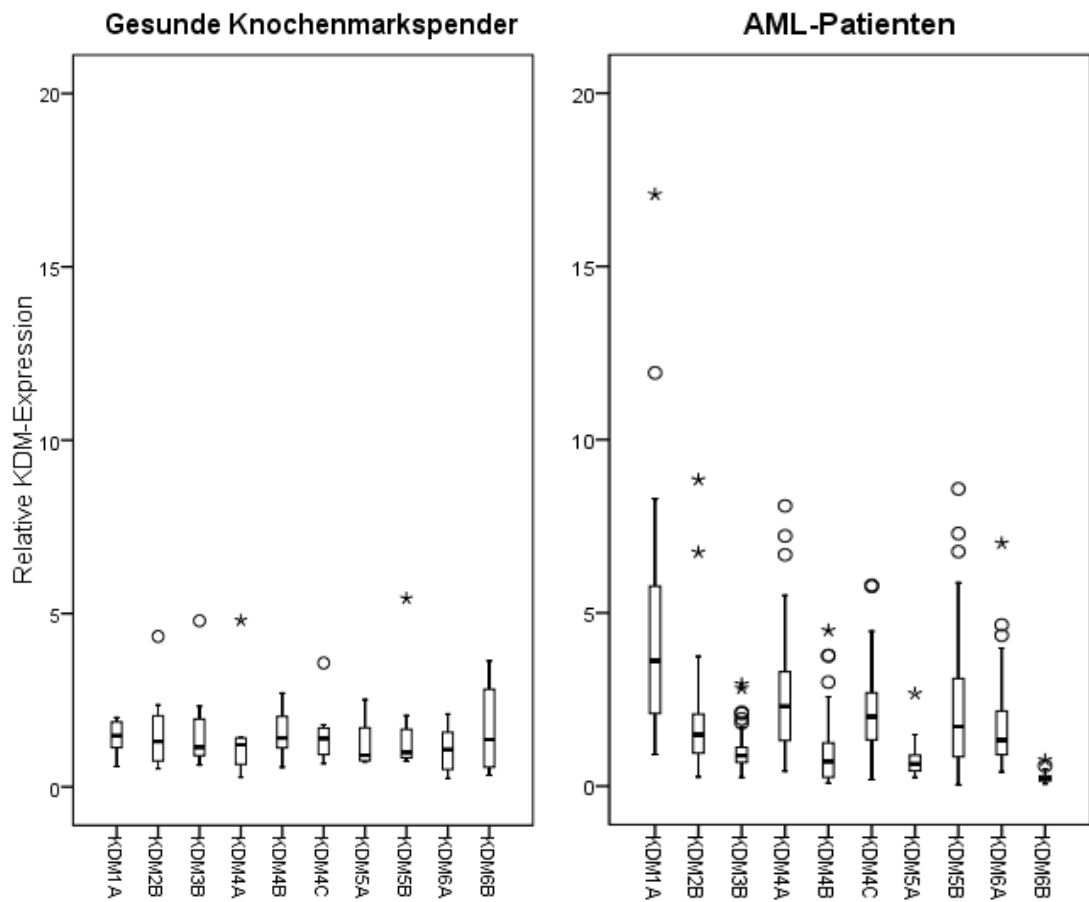


Abb. 9: Relative KDM-Expression in gesunden Knochenmarkspendern und AML-Patienten
 ° Ausreiser * extreme Ausreiser

4.1.2 Korrelation der KDM-Expression mit klinischen Parametern

Die KDM-Expressionsergebnisse wurden ebenfalls auf signifikante Korrelationen mit verschiedenen klinischen Parametern geprüft, die bei der Entstehung, Risikostratifizierung oder Prognose eine Rolle spielen. Untersucht wurde Geschlecht, Alter bei Diagnosestellung, initiale Leukozytenzahl, Erreichen einer kompletten Remission, ZNS-Befall, tödlicher Verlauf, Auerstäbchen, Karyotyp und durchgeführte KMT. Mit einem schlechten Verlauf assoziiert sind beispielsweise ein ZNS-Befall, bestimmte Karyotypen in Verbindung mit Auerstäbchen und die Notwendigkeit einer KMT. In Tab. 12 sind die mit dem Mann-Whitney-Test kalkulierten und der Holm-Bonferroni-Methode korrigierten p-Werte aufgeführt.

Eine signifikante Assoziation konnte bei der KDM5B mit dem Auftreten von Auerstäbchen ($p = 0,002$), der KDM6A mit dem weiblichen Geschlecht ($p = 0,001$) sowie bei der KDM6B mit einem ungünstigen Karyotyp ($p = 0,007$) festgestellt werden. Weiterhin waren mehrere „Trends“ erkennbar.

Ein Zusammenhang zwischen erhöhten oder verminderten KDM-Expressionen und ungünstigen klinischen pathologischen Parametern konnte nicht aufgezeigt werden.

	KDM1A	KDM2B	KDM3B	KDM4A	KDM4B	KDM4C	KDM5A	KDM5B	KDM6A	KDM6B
Geschlecht (w/m)	,648	,290	,308	,705	,705	,567	,808	,854	,001	,233
Alter zum Diagnosezeitpunkt (</>10)	,614	,669	,268	,614	,547	,277	,472	,103	,756	,522
Leukozytenzahl (</> 50)	,575	,460	,593	,721	,980	,491	,146	,296	,285	,126
Verstorben (ja/nein)	,341	,614	,509	,461	,756	,985	,372	,062	,669	,938
ZNS-Befall (ja/nein)	,057	,190	,275	,382	,151	,061	,435	,553	,201	,975
Auerstäbchen (ja/nein)	,170	,720	,550	,089	,020	,161	,370	,002	,698	,765
CR (ja/nein)	,779	,384	,911	,955	,227	,448	,060	,227	,227	,216
Karyotyp (günstig/normal)	,190	,353	,478	,743	,012	,382	,870	,252	,495	,007
KMT (ja/nein)	,452	,465	,388	,364	,364	,364	,084	1,00	,259	,859
Σ Bonferroni	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Σ Bonferroni + $p < 0,05$	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Σ "Trends" ($0,1 < p < 0,05$)	1	0	0	1	0	1	2	1	0	0

Tab. 12: Zusammenhang der KDM-Expressionen mit verschiedenen klinischen Parametern

4.2 Zellkulturexperimente an THP-1-Zellen

Nach den ermittelten KDM-Expressionshöhen in AML-Zellen folgten funktionelle Untersuchungen in Zellkulturmodellen anhand der zwei gewählten AML-Zelllinien THP-1 und KG-1. Die Zellen wurden mit den oft bei AML angewandten Zytostatika Etoposid und Cytarabin sowie dem KDM1A-Inhibitor SP2509 behandelt. Die Wahl fiel auf diesen Inhibitor, da die Expression von KDM1A signifikant erhöht war und für SP2509 bereits in anderen Publikationen (z. B. Fiskus et al. 2014) eine Wirkung auf AML-Zellen beschrieben wurde.

In den Vorversuchen erfolgte die Bestimmung der optimalen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung anhand von Konzentrations-Wirkungs-Kurven, um die Toxizität von SP2509 sowie von Etoposid und Cytarabin zu überprüfen. Die Zellen wurden in den Kombinationsversuchen mit dem KDM1A-Inhibitor behandelt und vier Stunden später mit dem entsprechenden Zytostatikum beimpft. Je nach funktionellem Test betrug die Inkubationszeit 24 h (Caspase-3-Aktivität) oder 48 h (durchflusszytometrische Analysen).

4.2.1 Vorversuche

Um das optimale Wirkungsspektrum der Zytostatika Etoposid und Cytarabin sowie des KDM1A-Inhibitors SP2509 bei THP-1 Zellen zu ermitteln, erfolgte zuerst die Analyse konzentrationsabhängiger Effekte auf den Zelltod und den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$). Bei SP2509 wurde zusätzlich die Caspase-3-Aktivität und die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung nach 48 h und 72 h auf den Zelltod verglichen. Da der Unterschied vor allem in den kleineren Konzentrationen sehr gering ausfiel, wurden alle nachfolgenden FACS-Analysen nach einer 48-stündigen Inkubationsdauer ausgewertet (Abb. 10 A).

Wie in Abb. 10 A sichtbar, zeigt sich ab 1 μM SP2509 ein Anstieg der konzentrationsabhängigen toxischen Wirkung. Dies ergab auch eine weitere Untersuchung in kleineren Konzentrationsschritten im Bereich von 1 bis 4 μM (Abb. 11). Für die Kombinationsexperimente sollten die gewählten Konzentrationen gerade noch nicht oder wenig zytotoxisch wirken, sodass 0,75 μM und 1 μM SP2509 verwendet wurden.

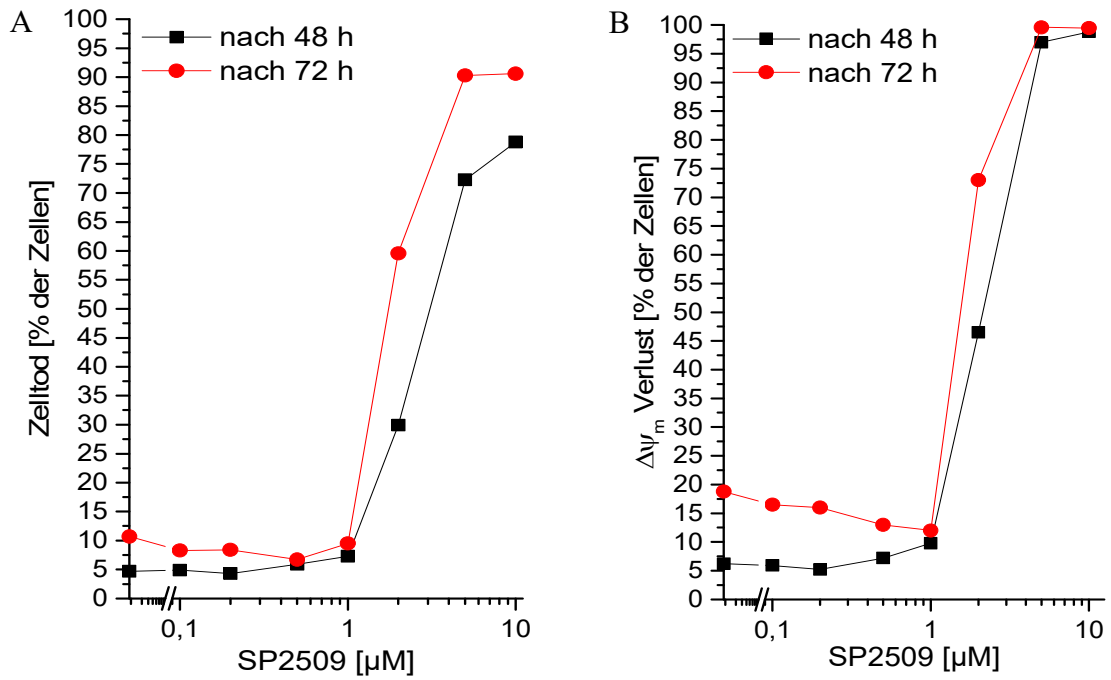


Abb. 10: Zelltod und Verlust des $\Delta\Psi_m$ in THP-1-Zellen in Abhängigkeit von der SP2509-Konzentration nach 48 h und 72 h

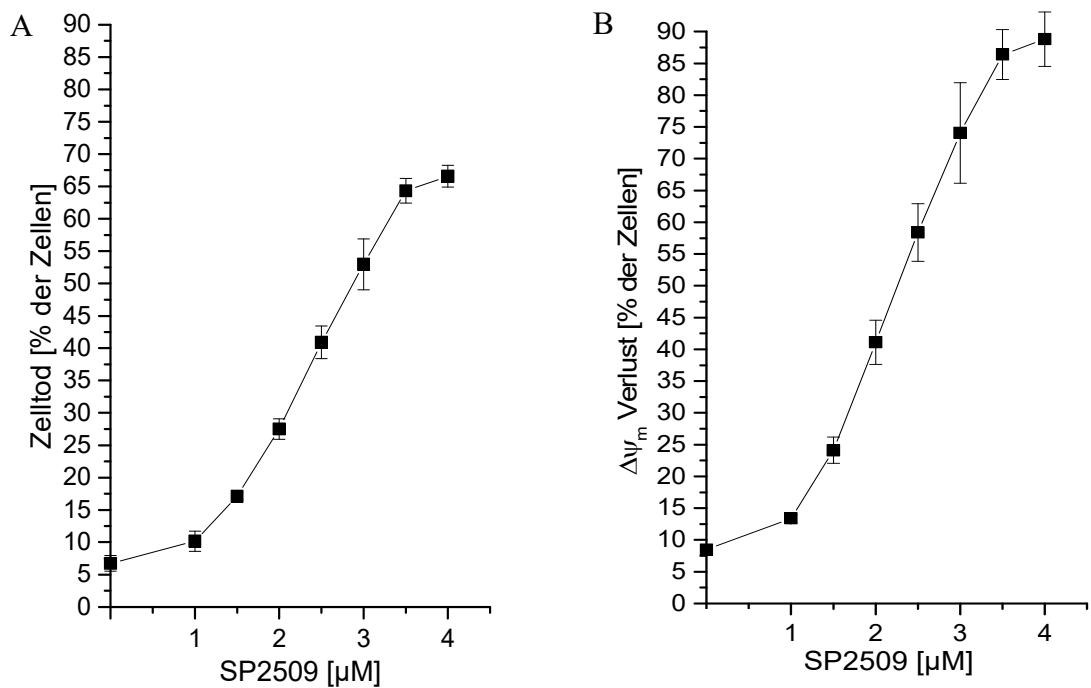


Abb. 11: Wirkung ausgewählter SP2509-Konzentrationen auf Zelltod und Verlust des $\Delta\Psi_m$ in THP-1-Zellen
Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei Messungen nach 48 h IKZ.

Für die Caspase-3-Messung wurden die THP-1-Zellen 24 h mit verschiedenen SP2509-Konzentrationen behandelt und anschließend ihre Caspase-3-Aktivität ermittelt. Die detektierte Caspase-3-Aktivität wurde auf diejenige unbehandelter Zellen normalisiert. Bei SP2509 ließ sich nach 24 h ebenfalls eine Steigerung ab 1 μM messen (Abb. 12).

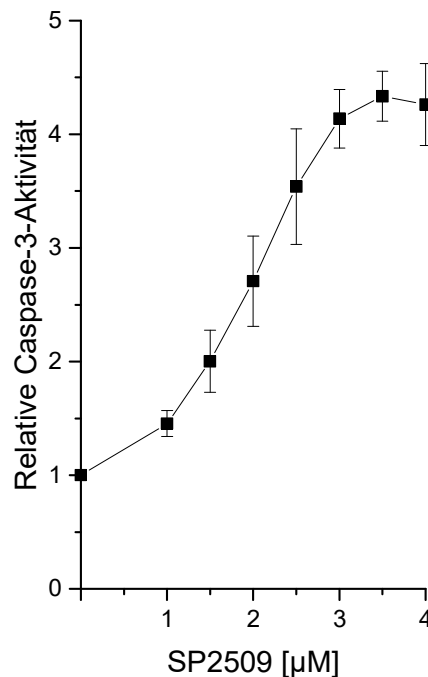


Abb. 12: Caspase-3-Aktivität in THP-1-Zellen nach SP2509-Behandlung

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je drei Experimenten nach 24 h Behandlung, die auf die Caspase-3-Aktivität unbehandelter Zellen normalisiert wurden.

Die THP-1-Zellen wurden ebenfalls mit verschiedenen Konzentrationen Etoposid und Cytarabin behandelt. Die Bestimmung des prozentualen Anteils toter Zellen erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme und die Bestimmung des Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) wurde anhand der DiOC6(3)-Färbung ermittelt.

Etoposid bewirkte bereits ab 0,1 μM einen deutlichen Effekt in den durchflusszytometrischen Analysen (Abb. 13 A und B). Aus den Vorversuchen ergaben sich die folgenden Konzentrationen für die Etoposid-Behandlungen: 0; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35 und 0,4 μM . In den Konzentrations-Wirkungs-Analysen von Cytarabin bei THP-1-Zellen zeigte sich nach 24-stündiger Behandlung ab 0,2 μM ein Anstieg der Toxizität in der Durchflusszytometrie (Abb. 13 C und D). Schlussfolgernd ergab sich für die Cytarabinapplikation die Konzentrationsreihe: 0, 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 und 1 μM .

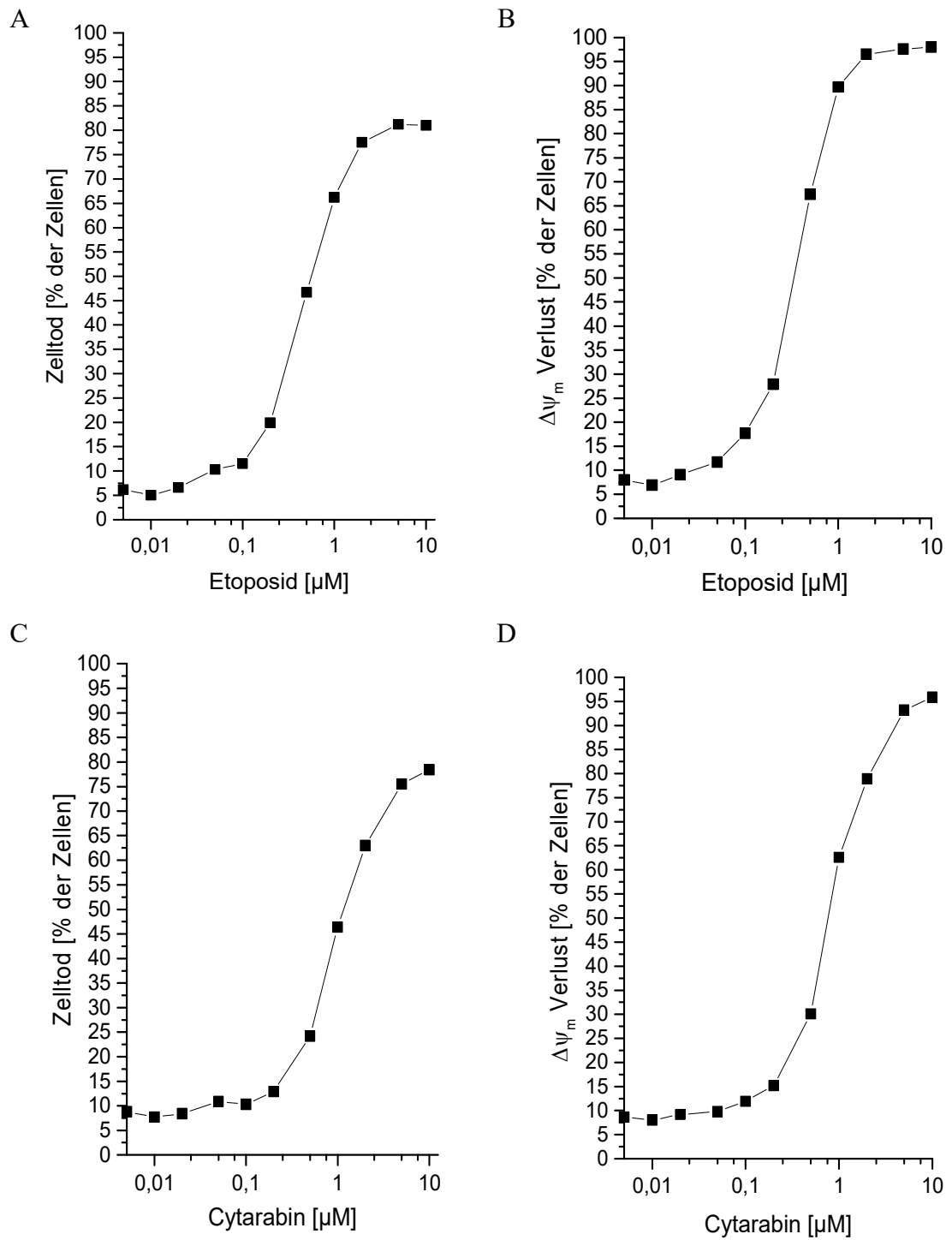


Abb. 13: Zelltod und $\Delta\Psi_m$ -Verlust in THP-1-Zellen in Abhängigkeit der Etoposid-(A, B) und Cytarabinkonzentrationen (C, D)
Messwerte einer Messung nach 48 h.

4.2.2 Kombinationsbehandlung mit Etoposid und SP2509

Neben der Monotherapie wurde auch die Kombination von SP2509 und Etoposid untersucht und es ließ sich eine synergistische Wirkung nachweisen (Abb. 14). SP2509 steigert im Vergleich zu den Kontrollzellen (0 μM SP2509), die nur mit Etoposid behandelt wurden, den prozentualen Zelltod um bis zu 15 % (0,75 μM SP2509) bzw. um 17 % (1 μM SP2509) (Abb. 14 A). Der Verlust des $\Delta\Psi_m$ erhöht sich um bis zu 24 % (0,75 μM SP2509) bzw. 27 % (1 μM SP2509). Eine deutliche additive Wirkung zeigt sich ab 0,15-0,3 μM Etoposid (Abb. 14 B). Die Vorbehandlung mit SP2509 führte auch zu einer Verstärkung der Etoposid-induzierten Caspase-3-Aktivität (Abb. 15) und bis zu einer Verdopplung der Etoposidwirkung. Wie in Abb. 15 gezeigt, fiel der Unterschied zwischen den beiden verschiedenen SP2509-Konzentrationen sehr gering aus.

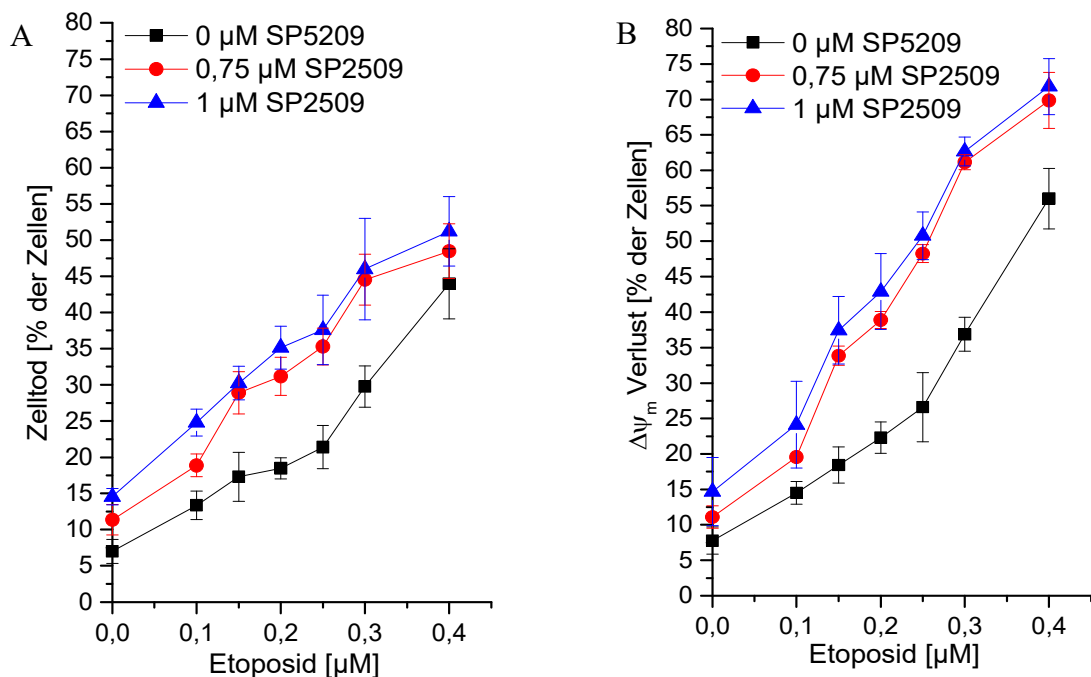


Abb. 14: Wirkung von SP2509 und Etoposid auf den Zelltod (A) und den Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B)
Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus je drei Messungen.

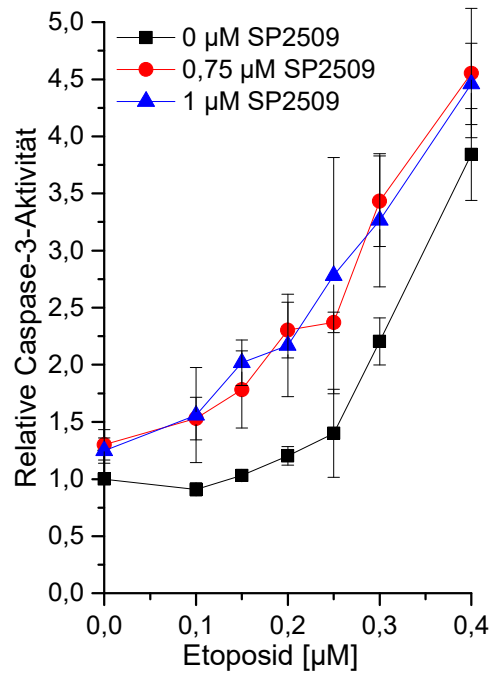


Abb. 15: Wirkung von SP2509 und Etoposid auf die Caspase-3-Aktivität in THP-1-Zellen
Die detektierte Caspase-3-Aktivität wurde auf die Aktivität unbehandelter Zellen normalisiert.

Zur Überprüfung des kooperativen Effekts wurden die Kombinationsindex-Werte (CI) aus den Ergebnissen berechnet. Werte über eins zeigen einen Antagonismus, Werte gleich eins einen additiven Effekt und Werte unter eins einen Synergismus auf. Werte zwischen 0,7 und 0,9 sind somit schwach und Werte unter 0,5 deutlich synergistisch. Für die Kombination mit Etoposid ergab sich ein gewisser Synergismus mit Werten zwischen 0,5 und 0,88. Nur die kleinste Konzentration erwies sich als antagonistisch.

SP2509 (µM)	Etoposid (µM) *	CI **
0,75	0,1	1,113
0,75	0,15	0,738
0,75	0,2	0,775
0,75	0,25	0,725
0,75	0,3	0,524
1	0,1	0,882
1	0,15	0,785
1	0,2	0,710
1	0,25	0,715
1	0,3	0,537

Tab. 13: CI-Werte für SP2509 zusammen mit Etoposid in THP-1-Zellen

* Werte der Zelltodanalyse; ** CI-Werte wurden mit der Chou-Talalay-Methode kalkuliert.

4.2.3 Kombinationsbehandlung mit Cytarabin und SP2509

Auch bei dem in kindlicher AML häufig verwendeten Zytostatikum Cytarabin konnte in Kombination mit SP2509 eine verstärkte zytotoxische Wirkung in THP-1 Zellen nachgewiesen werden. Die Wirkung von Cytarabin in mit 0,75 μM SP2509 vorbehandelten THP-1-Zellen auf den prozentualen Zelltod wurde dabei um bis zu 38 % und durch 1 μM SP2509 um bis zu 39 % verstärkt (Abb. 16 A). Die Verstärkung erreicht zwischen 0,1-0,2 μM Cytarabin ihr Maximum, danach flachte die synergistische Wirkung auf 22 % ab. Genau diese Effekte zeigten sich auch in der Bestimmung des $\Delta\Psi_m$ -Verlustes (Abb. 16 B). Die überadditive Wirkung zeigte sich deutlich zwischen 0,05 μM und 0,5 μM mit einem Maximum von 59 % (0,75 μM SP2509) und 62 % (1 μM SP2509). Es kam auch zu einer Verstärkung der Cytarabin-induzierten Caspase-3-Aktivität durch die Vorbehandlung mit SP2509 (Abb. 17).

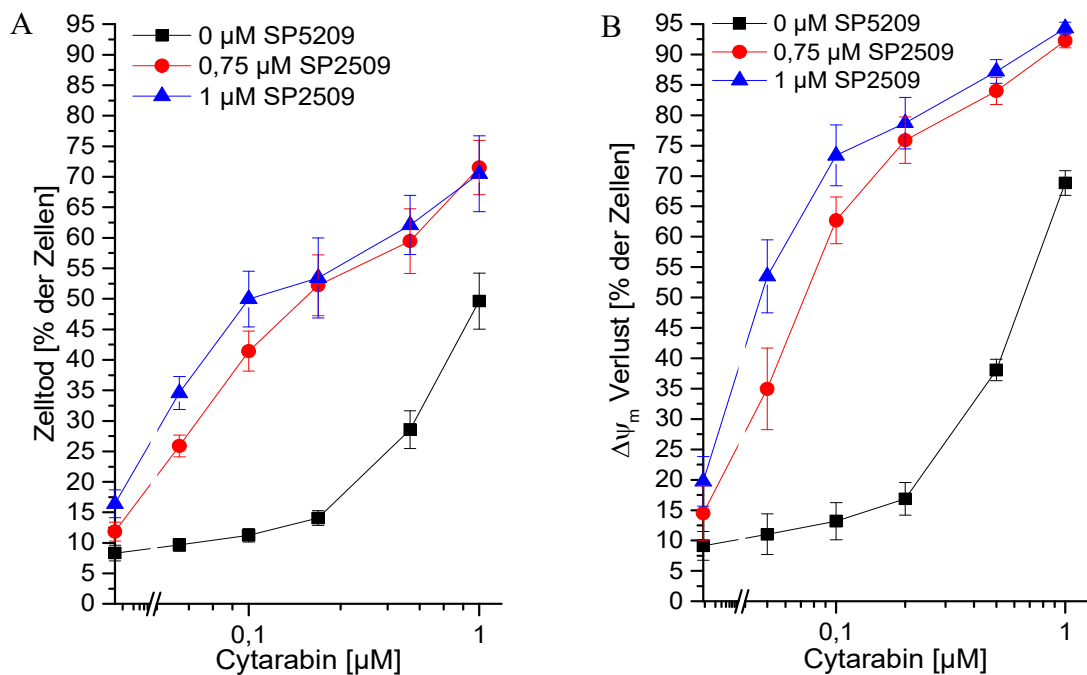


Abb. 16: Wirkung von SP2509 und Cytarabin auf den Zelltod (A) sowie den Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in THP-1-Zellen
Mittelwerte \pm SEM aus je drei Messungen sind dargestellt.

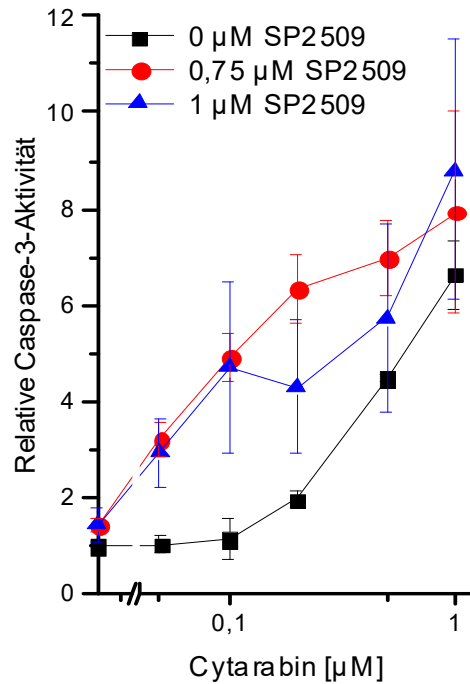


Abb. 17: Wirkung von SP2509 und Cytarabin auf die Caspase-3-Aktivität in THP-1-Zellen
Die detektierte Caspase-3-Aktivität wurde auf die Aktivität unbehandelter Zellen normalisiert.

Bei der CI-Bestimmung für die Kombination mit Cytarabin bei den THP-1 Zellen ergab sich ein deutlicher Synergismus mit der Mehrzahl der Werte kleiner 0,4.

SP2509 (µM)	Cytarabin (µM) *	CI **
0,75	0,05	0,620
0,75	0,1	0,391
0,75	0,2	0,327
0,75	0,5	0,375
0,75	1	0,320
1	0,05	0,547
1	0,1	0,356
1	0,2	0,376
1	0,5	0,382
1	1	0,375

Tab. 14: CI-Werte für SP2509 zusammen mit Cytarabin in THP-1-Zellen
* Werte der Zelltodanalyse; ** CI-Werte wurden mit der Chou-Talalay-Methode kalkuliert.

4.3 Zellkulturexperimente an KG-1-Zellen

4.3.1 Vorversuche

Bei den Untersuchungen an KG-1-Zellen zeigte sich eine geringere Empfindlichkeit auf SP2509 als in THP-1-Zellen. Für die Inhibitionsversuche der Lysin-Demethylasen wurden zuvor ebenso die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für SP2509 auf die Caspase 3-Aktivität, den Verlust von $\Delta\Psi_m$ und den Anteil toter Zellen erstellt. In der durchflusszytometrischen Konzentrations-Wirkungs-Analyse zeigte sich ab 1 μM SP2509 eine gesteigerte Toxizität von 10,5 % auf 56 % bei 10 μM . Der Verlust des Membranpotentials stieg sogar auf 77 % an (Abb. 18).

Wie in Abb. 19 erkennbar, sprachen die KG-1 Zellen bis 2 μM nicht auf die 24-stündige SP2509-Behandlung an und erst ab $> 2 \mu\text{M}$ kam es zu einer Stimulierung der Caspase-3-Aktivität. Besonders deutlich war der Anstieg von 1,4 auf 4 zwischen 5 μM und 10 μM SP2509. Für die Kombinationsversuche wurden die SP2509-Konzentrationen 1 μM und 1,5 μM ausgewählt, da bei kleineren Konzentrationen nur geringe Veränderungen feststellbar waren und bei höheren die Toxizität zu stark anstieg.

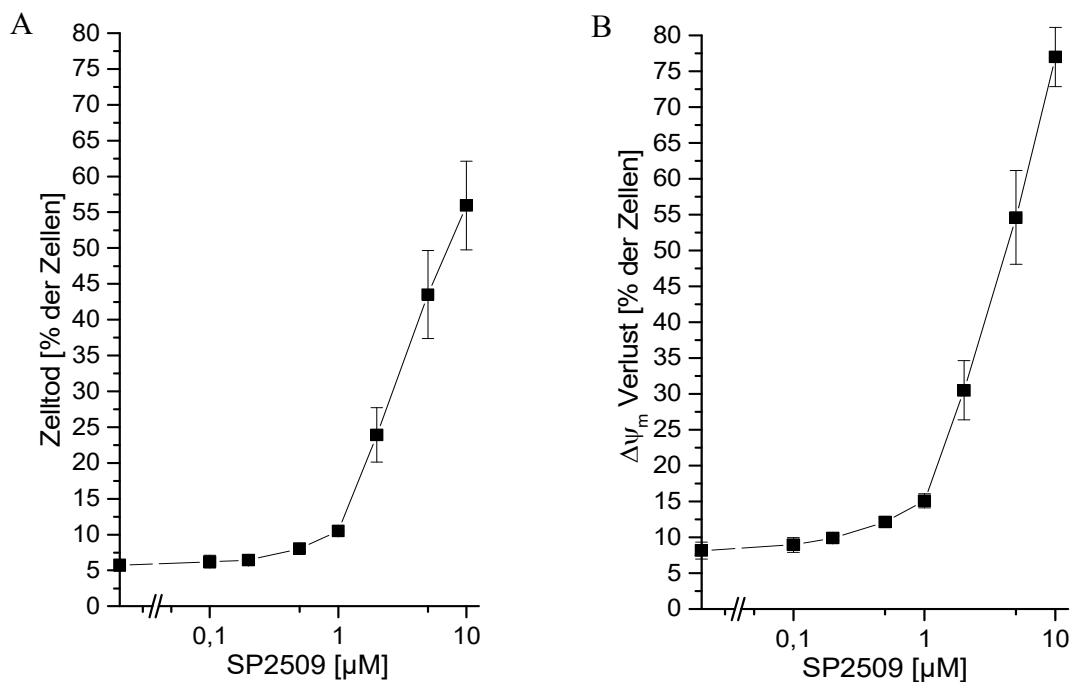


Abb. 18: Wirkung ausgewählter SP2509- Konzentrationen auf den Zelltod (A) und den Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in KG-1-Zellen.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei Messungen nach 48 h IKZ.

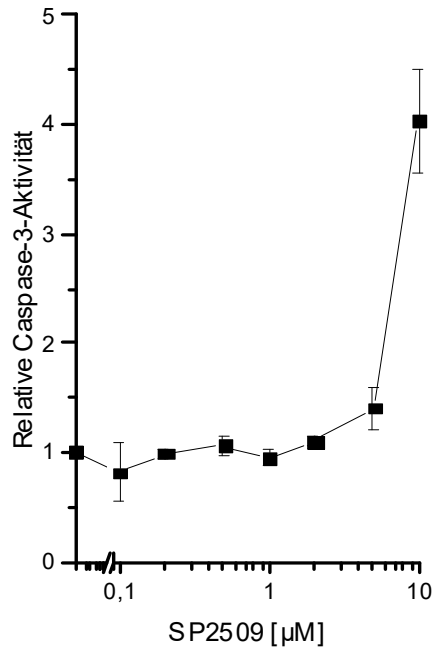


Abb. 19: Caspase-3-Aktivität in KG-1-Zellen nach SP2509-Behandlung

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je drei Experimenten nach 24 h Behandlung, die auf die Caspase-3-Aktivität unbehandelter Zellen normalisiert wurden.

KG-1-Zellen reagieren wie die THP-1-Zellen bis 0,1 μ M nicht auf Etoposid, jedoch sprechen sie auch in den höheren Konzentrationen schlechter an. So haben bei 5 μ M nur 29 % der Zellen PI aufgenommen im Gegensatz zu 81 % der THP-1-Zellen (Abb. 20 A, Abb. 13 A). Für die Kombinationsversuche ergaben sich so die Etoposidkonzentrationen 0; 0,5; 1; 2; 5 und 10 μ M.

Die maximal erreichten 47 % an toten Zellen bei 10 μ M Cytarabin wurden bei den THP-1-Zellen schon bei 1 μ M erreicht (Abb. 20 C, Abb. 13 C). Schlussfolgernd ergab sich die Konzentrationsreihe 0; 0,2; 0,5; 1; 2 und 5 μ M Cytarabin für die weiteren Versuche. Somit bestätigt sich auch bei den Zytostatika die geringere Empfindlichkeit der KG-1-Zellen.

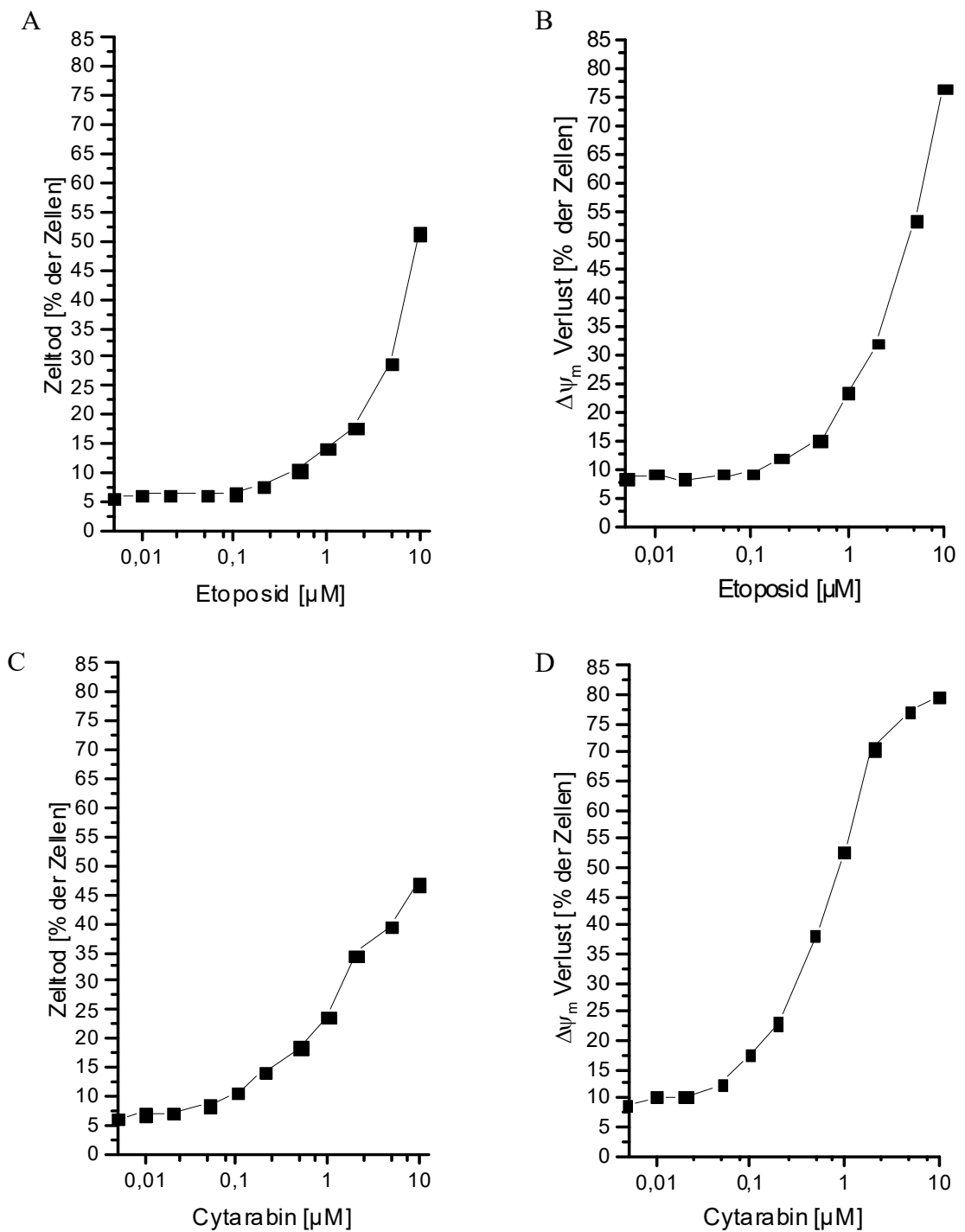


Abb. 20: Zelltod und $\Delta\Psi_m$ -Verlust in KG-1-Zellen in Abhängigkeit der Etoposid-(A, B) und Cytarabinkonzentrationen (C, D)
Messwerte einer Messung nach 48 h.

4.3.2 Kombinationsbehandlung mit Etoposid und SP2509

Auch bei den KG-1-Zellen folgten den Vorversuchen die Kombinationsversuche mit dem Zytostatikum Etoposid und dem KDM1A-Inhibitor SP2509, um im besten Falle eine synergistische Wirkung aufzuzeigen. Anders als bei den THP-1-Zellen blieb die Wirkung der Etoposidgabe konstant und nur die Eigentoxizität stieg in den durchflusszytometrischen Messungen an. So starben bei alleiniger Gabe von 1,5 μM des KDM1A-Inhibitors bereits 17 % der Zellen ab (Abb. 21 A) und über 20 % der Zellen wiesen kein mitochondriales Membranpotential mehr auf (Abb. 21 B). Die Kurven glichen sich anschließend immer mehr an, sodass sich kein synergistischer Effekt durch diese Kombination bestätigte und sich keine Wirkungsänderung durch die zusätzliche Gabe des Inhibitors ergab.

Die relative Caspase-3-Aktivität ergab bis 1 μM kaum einen Unterschied zwischen den drei Messungen. Bei den höheren Konzentrationen blieb die Aktivität der Kombinationen hinter der reinen Etoposidbehandlung sogar zurück (Abb. 22).

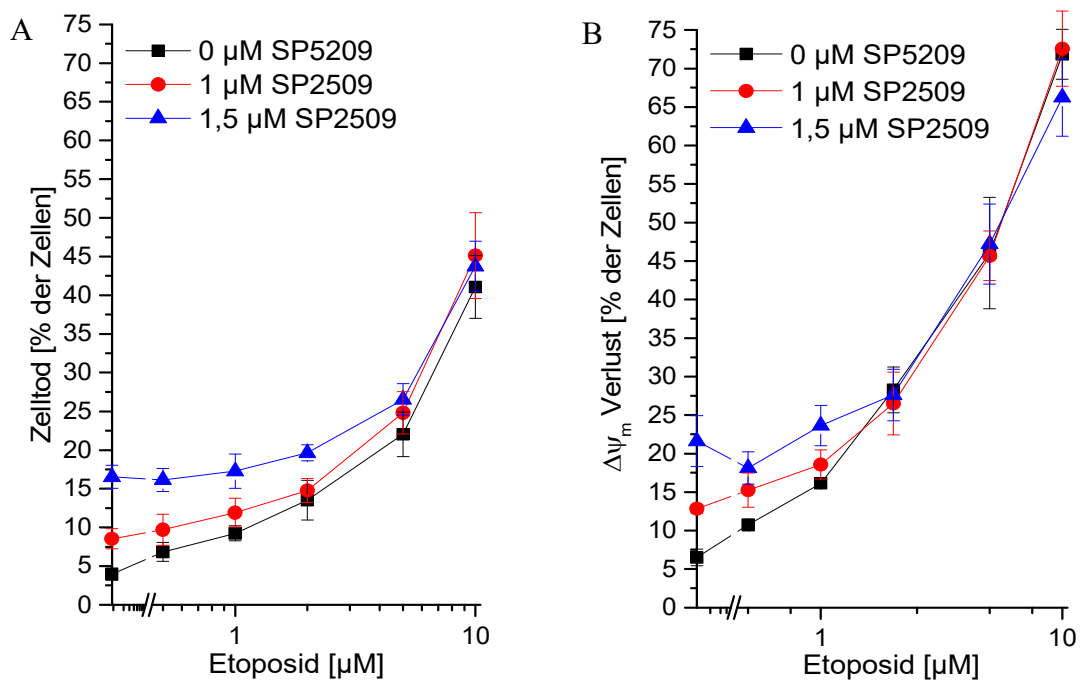


Abb. 21: Wirkung von SP2509 und Etoposid auf den Zelltod (A) sowie den Verlust des $\Delta\psi_m$ (B) in KG-1-Zellen
Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus je drei Messungen.

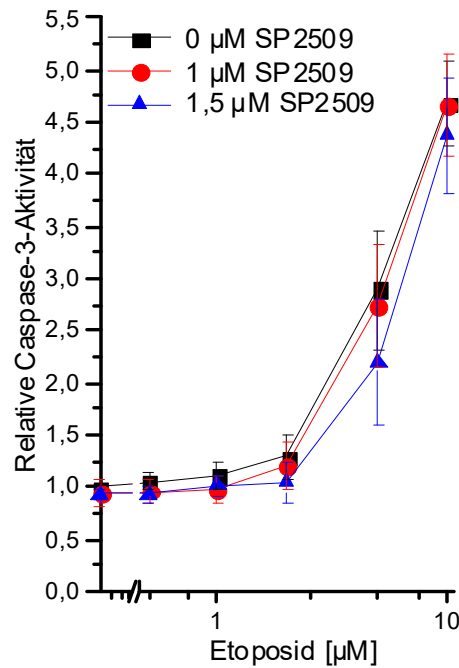


Abb. 22: Wirkung von SP2509 und Etoposid auf die Caspase-3-Aktivität in KG-1-Zellen
Die detektierte Caspase-3-Aktivität wurde auf die Aktivität unbehandelter Zellen normalisiert.

Auch bei den KG-1-Zellen wurden die Kombinationsindex-Werte berechnet. Bis auf die Kombination von 1 µM SP2509 mit 10 µM Etoposid zeigte sich durchgehend ein Antagonismus auf.

SP2509 (µM)	Etoposid (µM)	CI
1	0,5	1,349
1	1	1,467
1	2	1,693
1	5	1,373
1	10	0,922
1,5	0,5	1,204
1,5	1	1,282
1,5	2	1,519
1,5	5	1,565
1,5	10	1,126

Tab. 15: CI-Werte für SP2509 zusammen mit Etoposid in KG-1-Zellen
* Werte der Zelltodanalyse; ** CI-Werte wurden mit der Chou-Talalay-Methode kalkuliert.

4.3.3 Kombinationsbehandlung mit Cytarabin und SP2509

Die Vorbehandlung mit SP2509 führte auch in den KG-1-Zellen zu einer Verstärkung und einem additiven Effekt der Cytarabin-induzierten Caspase-3-Aktivität (Abb. 24) sowie zum erhöhten prozentualen Zelltod sowie $\Delta\Psi_m$ -Verlust (Abb. 23). Durch die SP2509-Behandlung stieg die Eigentoxizität um das Vierfache an. Die Wirkung von Cytarabin wurde durch 1 μM SP2509 um bis zu 6 % und durch 1,5 μM um bis zu 12 % verstärkt (Abb. 23 A). Im gesamten Verlauf blieben die Kurven weitestgehend konstant.

Bei der durchflusszytometrischen Messung des $\Delta\Psi_m$ -Verlustes erreichte die Verstärkung durch 1,5 μM SP2509 allerdings bei einer Konzentration von 1 μM Cytarabin ihr Maximum und flachte danach ab. Die Kurve von 1 μM SP2509 verlief bis 0,5 μM konstant. Erst anschließend erreichten die Veränderungen bis zu 12 % und überstiegen sogar die Werte der 1,5 μM SP2509-Messung (Abb. 23 B). Auch bei der Caspase-3-Analyse ließ sich eine Aktivitätszunahme darstellen (Abb. 24).

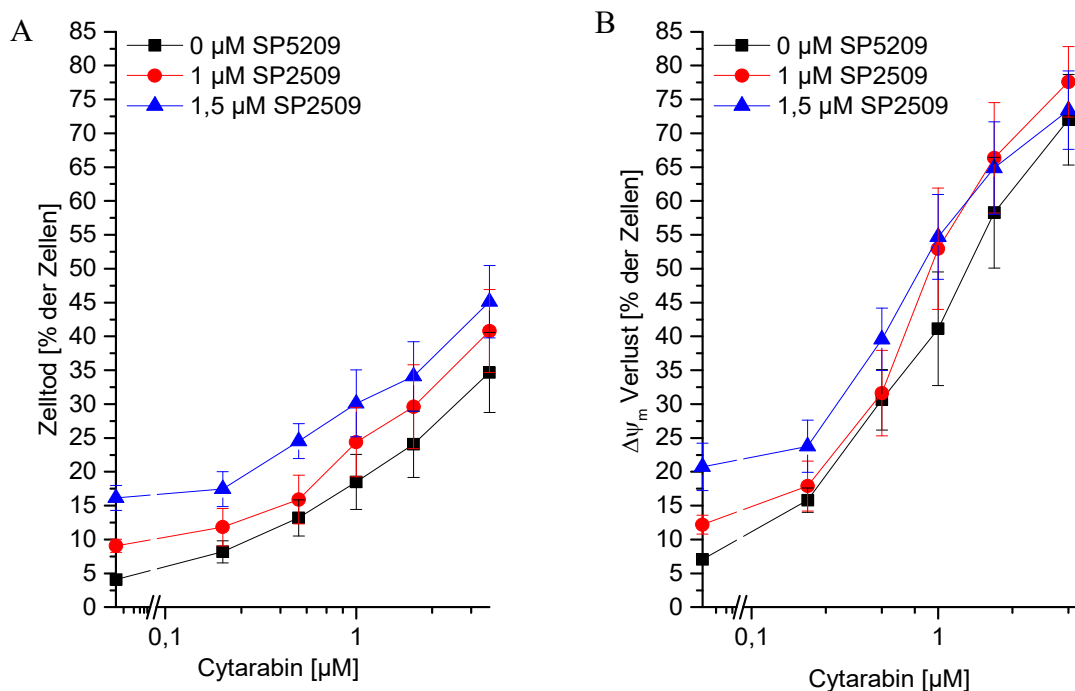


Abb. 23: Wirkung von SP2509 und Cytarabin auf den Zelltod (A) sowie den Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in KG-1-Zellen
Mittelwerte \pm SEM aus je drei Messungen sind dargestellt.

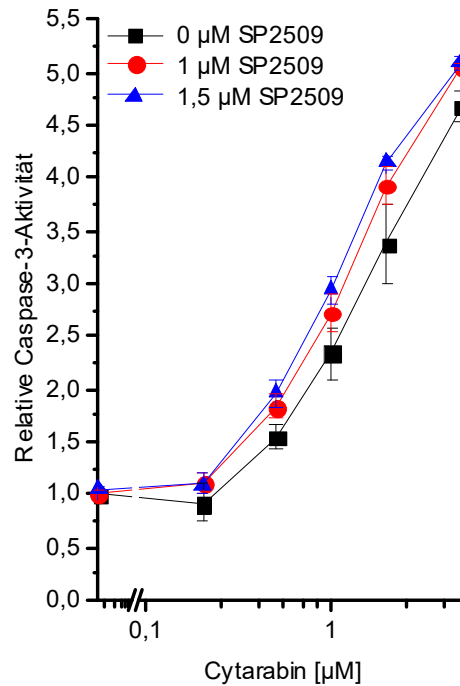


Abb. 24: Wirkung von SP2509 und Cytarabin auf die Caspase-3-Aktivität in KG-1-Zellen
Die detektierte Caspase-3-Aktivität wurde auf die Aktivität unbehandelter Zellen normalisiert.

Wie in Tab. 16 erkenntlich, ergaben sich bei der CI-Werte-Kalkulation für die Kombinationen von 1 µM SP2509 mit 0,2 und 0,5 µM und 1,5 µM SP2509 mit 0,2 µM Cytarabin antagonistische Werte, für die restlichen Kombinationen ein schwacher Synergismus.

SP2509 (µM)	Cytarabin (µM)	CI
1	0,2	1,244
1	0,5	1,174
1	1	0,871
1	2	0,774
1	5	0,821
1,5	0,2	1,078
1,5	0,5	0,965
1,5	1	0,870
1,5	2	0,874
1,5	5	0,812

Tab. 16: CI-Werte für SP2509 zusammen mit Cytarabin in KG-1-Zellen

* Werte der Zelltodanalyse; ** CI-Werte wurden mit der Chou-Talalay-Methode kalkuliert.

4.4 Z-VAD Versuche

Die Caspasen spielen eine Schlüsselrolle in der Apoptose, dem programmierten Zelltod. Mit Hilfe des Pan-Caspase-Inhibitors Z-VAD wurde untersucht, welchen Zelltodmechanismus die Zytostatika Etoposid und Cytarabin sowie SP2509 in THP-1 und KG-1-Zellen induziert. Hierzu wurden die Zellen eine Stunde vor Behandlung mit 20 μ M Z-VAD vorbehandelt.

Die Untersuchung erfolgte mittels durchflusszytometrischer Tests, welche die Wirkungen auf Zelltod und $\Delta\Psi_m$ -Verlust ohne und mit Zusatz von Z-VAD analysierten.

Es zeigen sich zelllinienabhängige Unterschiede. So kam es bei den mit Z-VAD vorbehandelten THP-1-Zellen nur zu einer sehr geringen Abschwächung der zelltodinduzierenden Wirkung im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 25). Bei den KG-1-Zellen kam es sogar zu einem leichten Anstieg des prozentualen Zelltodes, jedoch auch zu einer leichten Abschwächung der Etoposid- und Cytarabinwirkung (Abb. 26).

Die schwachen Effekte von Z-VAD deuten auf einen Caspaseunabhängigen Zelltodmechanismus bei allen getesteten Substanzen und Zelllinien.

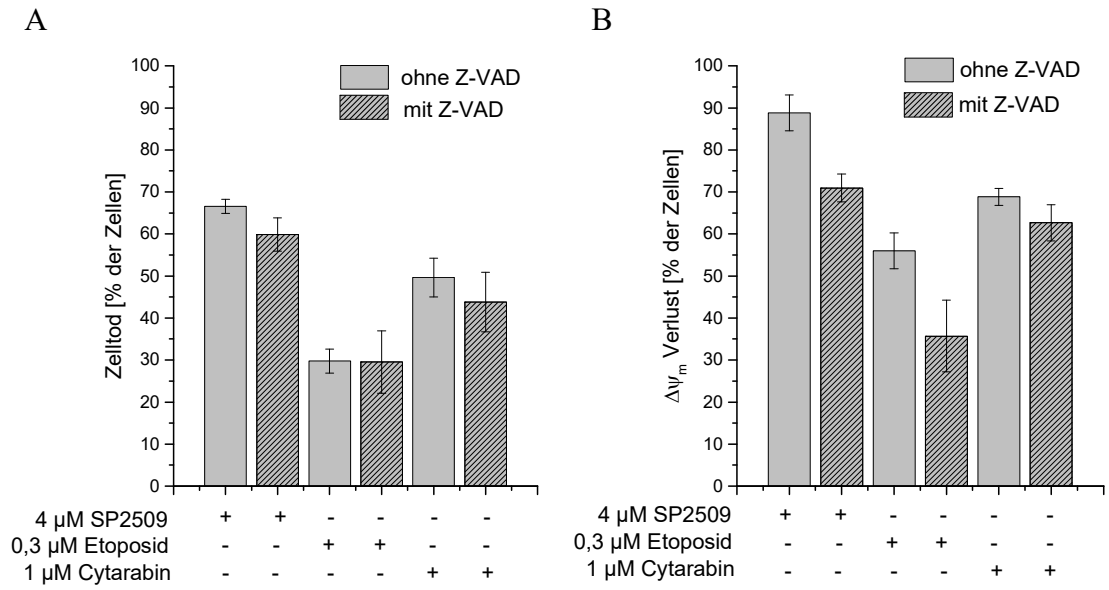


Abb. 25: Wirkung von 20 μ M Z-VAD auf den Zelltod (A) und den Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in THP-1 Zellen
 Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus je drei Messungen.

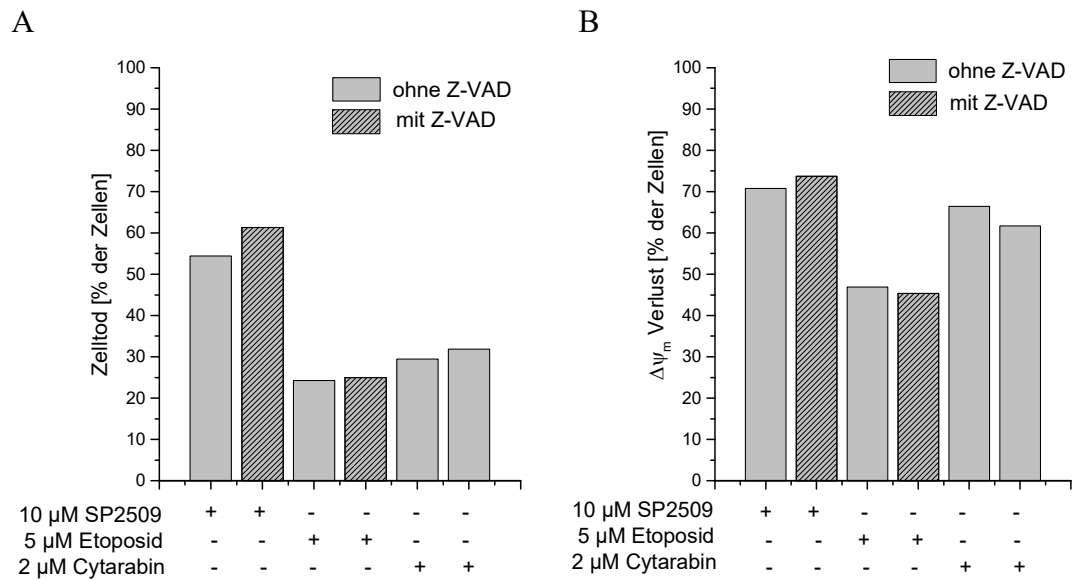


Abb. 26: Wirkung von 20 μ M Z-VAD auf den Zelltod (A) und den Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in KG-1-Zellen
 Dargestellt sind die Messwerte einer Messung.

4.5 Expressionsanalyse von p21 bei THP-1-Zellen

Eine weitere Expressionsanalyse erfolgte in behandelten THP-1-Zellen zur Untersuchung der relativen p21-mRNA-Expression. Dabei zeigte sich bei mit SP2509 behandelten Zellen je nach Konzentrationsanstieg eine deutlich erhöhte Expression von p21 (Abb. 27 A). Bei den zytostatisch behandelten Zellen ergab sich bei der alleinigen Cytarabingabe (0,2 μ M) eine Verdopplung der p21-Expression. Bei Etoposid (0,25 μ M) war der Effekt nur sehr gering. Am deutlichsten stieg die p21-Expression bei der Kombinationsbehandlung des KDM1A-Inhibitors SP2509 mit dem Zytostatikum Cytarabin an. Im Vergleich zur alleinigen Cytarabingabe stieg die relative Expression von 2 auf 4,5 an. Bei der Untersuchung der kombinationsbehandelten Zellen mit Etoposid und SP2509 war nur ein geringer Expressionsanstieg zu verzeichnen.

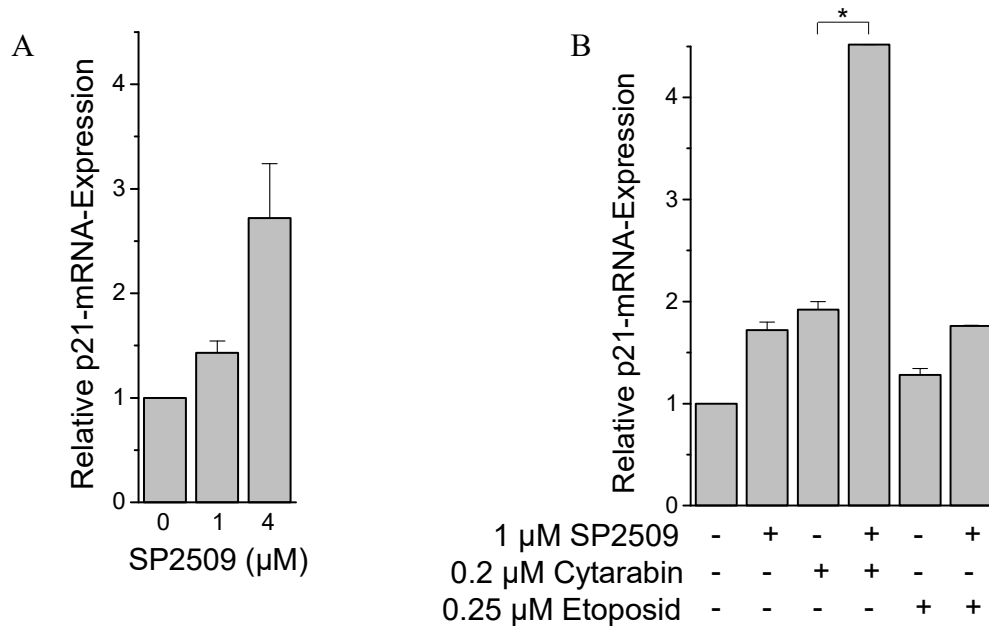


Abb. 27: Relative p21-mRNA-Expression bei behandelten THP-1-Zellen

5 Diskussion

Krebs wurde lange Zeit als rein genetische Erkrankung angesehen. In der aktuellen Krebsforschung hat sich jedoch herauskristallisiert, dass Chromatin- und epigenetische Aberrationen eine wichtige Rolle bei der Tumorpotenzierung, -initiierung und -progression spielen und dass in diese Prozesse eingreifende Enzyme somit einen potentiellen neuen Angriffspunkt in der antitumoralen Therapie darstellen (Flavahan et al. 2017). Um eine wichtige epigenetisch wirkende Enzymgruppe handelt es sich bei den Histon-Lysin-Demethylasen (KDM) (Tian et al. 2013).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte erstmalig die Genexpression zehn ausgewählter KDMs in pädiatrischen AML-Proben im Vergleich zu KDM-Expressionsniveaus in Knochenmarkproben von gesunden Spendern mittels Real-Time RT-PCR untersucht werden. Im Anschluss sollte überprüft werden, ob es zwischen den Expressionshöhen der KDMs und bestimmten klinisch-pathologischen Faktoren eine Assoziation geben und ob es durch den Einsatz spezifischer KDM-Inhibitoren zu einer Auslösung des Zelltodes kommen könnte. Doch nicht nur die alleinige Wirkung spezifischer KDM-Inhibitoren auf kindliche Leukämiezellen sollte überprüft werden, sondern auch ihre Kombination mit den Zytostatika Etoposid und Cytarabin.

5.1. Expressionsanalyse - KDM1A und KDM6B als potentielle therapeutische Angriffspunkte in pädiatrischer AML

Von den zehn analysierten KDMs zeigte sich bei zwei KDMs eine Fehlregulierung in AML-Zellen im Vergleich zu normalen hämatopoetischen Vorläuferzellen. KDM1A war signifikant hochreguliert und KDM6B herunterreguliert in den AML-Proben.

Die KDM1A wurde im Jahr 2004 von Shi et al. als erste Lysin-spezifische-Demethylase (LSD1) beschrieben und spielt eine wichtige Rolle bei der Demethylierung von Histon H3 an Lysin 4 und 9 sowie von Nicht-Histon-Proteinen wie dem Tumorsuppressor-Protein p53 (Shi et al. 2004, Huang et al. 2007). Diese Demethylierung verhindert die Wechselwirkung von p53 mit dem p53-bindendem Protein 1 (53BP1), welches die Funktionen von p53 als Koaktivator unterstützt, einschließlich der Apoptoseinduktion (Huang et al. 2007).

In verschiedensten Studien konnte bereits eine onkogene Rolle, insbesondere in hämatopoetischen Neoplasien, gezeigt werden (Dawson und Kouzarides 2012, Højfeldt et al. 2013). Auch ein Zusammenhang zwischen einer hohen Expression von KDM1A und einer schlechten Prognose in verschiedensten Tumoren wurde von Wu et al. 2015 beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Korrelationen der

KDM1A-Expression mit den klinischen Parametern Geschlecht, Alter zum Diagnosezeitpunkt, initiale Leukozytenzahl, tödlicher Verlauf, ZNS-Befall, Vorhandensein von Auerstäbchen, komplette Remission, Karyotyp und Benötigen einer Knochenmarktransplantation ergaben keine signifikante Assoziation. Ein Trend mit $p = 0,057$ war für den ZNS-Befall erkennbar, welcher meist mit einer schlechten Krankheitsprognose verknüpft ist. Jedoch konnte ein sicherer Zusammenhang zwischen den erhöhten KDM1A-Expressionen und einer schlechten Prognose nicht nachgewiesen werden.

Es sollte jedoch nicht übersehen werden, dass KDM1A auch krebsunterdrückende Wirkung haben kann z. B. in Metastasen von Brust- und Prostatakrebszellen (Wang et al. 2009, Ketscher et al. 2014) oder Glioblastomzellen (Kozono et al. 2015).

Diese unterschiedlichen Beobachtungen zeigen, dass die Hemmung der KDM1A in einigen Krebsarten nützlich und in anderen schädlich sein kann. Im Zusammenhang mit der kindlichen AML konnte in dieser Dissertation die KDM1A als potenziell nützliches Medikamentenziel aufgedeckt werden, was es zu einem attraktiven therapeutischen Ziel macht.

Das JmJC-Domänenhaltige Protein KDM6B (auch JMJD3 genannt) katalysiert die Demethylierung von H3K27me3 sowie von H3K27me2 und scheint auf der Transkriptionsstufe stark reguliert zu sein. Auf Reize wie Differenzierungsinduktoren und Stresssignale wird es hochreguliert, wodurch es mit verschiedenen biologischen Prozessen wie der Differenzierung von embryonalen Stammzellen, entzündlichen Reaktionen in Makrophagen und der Induktion zellulärer Seneszenz durch Regulation des INK4A-ARF-Locus verknüpft ist (Williams et al. 2014).

Doch die Rolle von KDM6B ist komplizierter, da die aktuelle Forschung widersprüchliche Funktionen dieses Enzyms entdeckt hat und diese Demethylase eine kontextabhängige Rolle bei Krebs zu haben scheint. Die KDM6B scheint das nukleäre p53 zu stabilisieren und die Expression von p21 unabhängig vom p16-, p14- oder p53-Weg zu induzieren, um den partiellen Zellzyklus-Arrest und die Differenzierung in Keimbahn-Stammzellen zu unterstützen und die Tumorentstehung zu verhindern. Andere Studien haben gezeigt, dass KDM6B die Expression des NOTCH1-Onkogens bei Leukämie kontrolliert und so bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von T-ALL beteiligt ist (D'Oto et al. 2016). Bei Brustkrebszellen spielt KDM6B eine Rolle bei der Transkriptionsaktivierung des anti-apoptotischen Protein Bcl2 in einer ER α -abhängigen Weise (D'Oto et al. 2016).

Es zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit, dass die Expression in den AML-Zellen im Vergleich zu den Spenderproben bei KDM6B signifikant verringert ($p < 0,001$) war. Eine Assoziation konnte zwischen diesen erniedrigten Expressionswerten und den ungünstigen Karyotypen t(8;21), t(15;17), inv(16) mit $p = 0,007$ nach Bonferroni gefunden werden. Weitere Korrelationen mit klinischen Parametern waren jedoch nicht zu erkennen.

5.2 Aktivität des KDM1A-Inhibitors SP2509

Auf Grund der Feststellung, dass KDM1A deutlich stärker in den AML-Patientenproben exprimiert wurde, folgte die Untersuchung von KDM1A als therapeutisches Ziel in kindlicher AML. Aus der Literatur ist zu erfahren, dass die Inhibierung der KDM1A das Wachstum von Teratokarzinomen, embryonalen Karzinomen, Seminomen und kleinzelligen Lungenkrebszellen hemmt (Wang et al. 2011, Mohammad et al. 2015).

In Bezug auf Leukämien zeigte Harris et al. 2012, dass die KDM1A für das MLL-assoziierte onkogene Genexpressionsprogramm in MLL-AF9-Leukämiezellen benötigt wird und dass die Hemmung der KDM1A zur Reduzierung des klonogenen Potentials in Leukämiezellen führt. Über pädiatrische Leukämien ist bekannt, dass die Überexpression von KDM1A die Entwicklung der T-Zellen-ALL fördert (Wada et al. 2015).

Zum Zweck der systematischen Hemmung in pädiatrischen AML-Zellen kam in meiner Arbeit der niedermolekulare KDM1A-Inhibitor SP2509 als Monotherapie und in Kombination mit Cytarabin und Etoposid in den kindlichen AML-Zelllinien THP-1 und KG-1 zum Einsatz. Bei dem von Sorna et al. 2013 erstmalig beschriebenen N'-(1-phenylethyliden)benzohydrazid handelt es sich um einen hochwirksamen, spezifischen, nicht-kompetitiven, reversiblen KDM1A-Inhibitor.

Die Aktivität von SP2509 wurde durch die durchflusszytometrische Zelltod- und $\Delta\psi_m$ -Analyse mittels PI-Aufnahme und DiOC₆(3)-Färbung und die Apoptoseinduktion mit Hilfe der Caspase-3-Aktivitätsmessung bestimmt. SP2509 zeigt als Einzelwirkstoff bereits bei Konzentrationen im niedrigen Mikromolarbereich potente Wirkung, indem es den Zelltod und den Verlust des $\Delta\psi_m$ in einer konzentrationsabhängigen Weise sowohl in THP-1- als auch in KG-1- Zellen induzierte. Bei der Caspase-3-Messung zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den zwei Zelllinien. In den THP-1-Zellen kam es ebenfalls zu einer deutlichen Stimulierung der Caspase-3-Aktivität, ähnlich dem Bild der

durchflusszytometrischen Ergebnisse. Dies legte einen Caspase-3-abhängigen, apoptotischen Zelltod nahe. In den KG-1-Zellen konnte in den niedrigen Konzentrationen kein Anstieg der Aktivität registriert werden und erst ab 5 μM kam es zu einer starken Erhöhung. Um zu überprüfen, ob Caspaseaktivitäten tatsächlich an der Vermittlung des Zelltodes beteiligt waren, wurden Analysen mit dem Pancaspasen-Inhibitor Z-VAD durchgeführt. Dies zeigte bei den THP-1-Zellen einen nur geringen Rückgang des Zelltodes und des $\Delta\psi_m$ und bei den KG-1-Zellen hatte Z-VAD gar keine Wirkung. Diese Befunde machen einen Caspase-unabhängigen Zelltodmechanismus wahrscheinlich und deuten darauf hin, dass die insbesondere in THP-1-Zellen beobachtete Caspase-3-Aktivierung für den Zelltod nicht ausschlaggebend ist.

Bei dem auch als „Wächter des Genoms“ (Lane 1992) bezeichneten p53 handelt es sich um das bedeutendste Tumorsuppressor-Protein. Als Transkriptionsfaktor trägt es vor allem nach Aktivierung durch DNA-Schäden zur Verhütung von Tumoren bei. Dies geschieht durch Zellzyklusarrest, Induktion der Apoptose, Seneszenz und/oder Beteiligung an der DNA-Reparatur. In jedoch über 50 % der menschlichen Tumoren liegt p53 mutiert vor, wodurch es in der großen Mehrzahl der Fälle seine Funktion verliert und sogar onkogene Eigenschaften annehmen kann (Liu et al. 2015). Es ist somit das am häufigsten mutierte Gen bei menschlichen malignen Erkrankungen.

Die untersuchten THP-1-Zellen exprimieren ein mutiertes inaktives p53 (Sugimoto et al. 1992), sodass die beobachteten Effekte in dieser Zelllinie unabhängig vom funktionellem p53 auftraten. Von möglicher klinischer Bedeutung ist somit, dass SP2509 als spezifischer KDM1A-Hemmer kein funktionsfähiges p53 zur Ausübung seiner antitumorösen Effekte benötigt.

Auch die Wirksamkeit der Chemotherapie kann vom p53-Status des Tumors abhängen, was erklärt, warum Medikamente, die nicht von einem funktionsfähigem p53 abhängen, klinisch bedeutsam sind (Soussi und Beroud 2001). Besonders AML-Zellen mit mutiertem p53 zeigen sich eher tolerant gegenüber der Cytarabin-Behandlung (Yin et al. 2006). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass SP2509 und Cytarabin eine wirksame Kombination für die Behandlung dieser AML-Fraktion mit besonders schlechter Ansprechbarkeit der Chemotherapie sein können.

5.3 Wirkung von SP2509 auf die Zytostatikatoxizität

Das vielleicht bemerkenswerteste Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die Hemmung der KDM1A die AML-Zellen für Zytostatika sensibilisiert. Die Co-Behandlung mit SP2509 verstärkte vor allem bei den THP-1-Zellen die zytotoxische Wirkung von Cytarabin und Etoposid, zwei Zytostatika, die üblicherweise bei der Behandlung von kindlicher AML verwendet werden (Rubnitz und Inaba 2012).

Die kooperative Wirkung wurde insbesondere in Verbindung mit Cytarabin bei den THP-1-Zellen deutlich. Beispielsweise 1 μM SP2509 induzierte den Zelltod in 16 % der Zellen und 0,1 μM Cytarabin in 11 %, während die Kombination der beiden Verbindungen in 50 % zum Zelltod führte. Bei der Kombination mit Etoposid steigerte sich der Anteil Toter Zellen um 24 % (0,75 μM SP2509) bzw. 27 % (1 μM SP2509). Anders als bei den THP-1-Zellen blieb die Wirkung von Etoposid in den KG-1-Zellen konstant und es konnte keine Wirkungsveränderung des Zytostatikums durch die Kombination mit dem KDM1A-Inhibitoren erzielt werden. Es zeigte sich jedoch ein deutlicher Anstieg der Eigentoxizität bei der alleinigen SP2509-Gabe.

Zur Prüfung der Synergie wurden die Daten mit dem Chou-Talalay-Verfahren analysiert. In den von einem erwachsenen AML-Patienten abstammenden KG-1-Zellen führten nur die Kombinationen von Cytarabin mit SP2509 zu einem schwachen Synergismus, teilweise sogar zu einem schwachen Antagonismus bei den niedrigen Cytarabinkonzentrationen. Die Verbindung von Etoposid mit SP2509 zeigte einen durchgehenden Antagonismus, bis auf die Ausnahme von 1 μM SP2509 mit 10 μM Etoposid, wo sich ein sehr schwacher Synergismus ergab. Bei den von einem Kind abstammenden THP-1-Zellen offenbarten sich synergistische Wechselwirkungen für alle getesteten Kombinationen, mit Ausnahme der kleinsten Konzentrationskombination von 0,1 μM Etoposid und 0,75 μM SP2509.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass die kombinierte Behandlung der bisherigen Zytostatika mit dem KDM1A-Inhibitor SP2509 zu einer synergistischen Abtötung von AML-Zellen bei erkrankten Kindern führen kann. Am dominantesten war der Effekt durch die Kombination von SP2509 und Cytarabin bei den THP-1-Zellen, aber auch die Kombination von SP2509 und Etoposid zeigte, wenn auch schwächer, additive Effekte. Es besteht somit die Möglichkeit, durch das Hinzufügen von SP2509 zur Standard-Chemotherapie Arzneimittelresistenz zu überwinden.

Die Chemotherapieresistenz stellt ein Haupthindernis für den Behandlungserfolg der Krebstherapie, vor allem auch in der pädiatrischen AML-Therapie, dar (Creutzig et al.

2012, Zwaan et al. 2015). Etwa 5 % der Kinder mit AML haben eine primäre refraktäre Erkrankung und etwa 30 % erleiden einen Rückfall. Die Überlebenswahrscheinlichkeit dieser Patienten liegt selbst in den jüngsten Studien bei weniger als 40 % (Sander et al. 2010, Kaspers et al. 2013).

Starke Nebenwirkungen derzeitiger Behandlungsschemata, wie die Anthrazyklin-vermittelte Kardiomyopathie, erlauben keine weitere Eskalation der Chemotherapie (Zwaan et al. 2015), weshalb es von größter Wichtigkeit ist, neue Wege zu finden, um der Arzneimittelresistenz entgegenzuwirken. Die Beeinflussung epigenetischer Veränderungen, wie in dieser Arbeit mittels SP2509, sind dahingehend vielversprechend, um den Behandlungserfolg zu maximieren.

5.4 p21-Expression in mit SP2509 behandelten THP-1-Zellen

Um zu klären, ob SP2509 eine Wirkung auf die Genexpression in AML-Zellen hat, wurden die mRNA-Spiegel des Cyclin-abhängigen Inhibitorproteins p21 (das Genprodukt von CDKN1A) bestimmt. In erwachsenen AML-Zellen konnte durch Fiskus et al. 2014 bereits gezeigt werden, dass die Expression von p21 durch SP2509 induziert wird. SP2509 schwächt die Bindung von KDM1A mit dem Ko-Repressor CoREST, was die permissive H3K4me3-Markierung auf den Zielgen-Promotoren und die Spiegel von p21, p27 und CCAAT/Enhancer-Bindungsprotein α erhöht. Ein Effekt von SP2509 auf die p21-Genexpression konnte ebenso bei den pädiatrischen AML-Zellen nachgewiesen werden, denn es zeigte sich, dass SP2509 in einer dosisabhängigen Weise in THP-1-Zellen die p21-mRNA-Spiegel erhöht.

Wie in den Ergebnissen sichtbar, zeigte sich, dass die kombinierte Behandlung mit dem KDM1A-Inhibitor SP2509 und Cytarabin zu einer synergistischen Abtötung von kindlichen AML-Zellen führte. Interessanterweise wurden die Effekte auf den Zelltod durch Effekte auf die p21-mRNA-Spiegel widerspiegelt: Die p21-Spiegel waren am stärksten durch die Kombination von SP2509 und Cytarabin erhöht, was darauf hindeutet, dass SP2509 die Modulation der Genexpression beinhaltet. Im Vergleich zu der alleinigen Cytarabingabe zeigte die Kombinationsbehandlung mit SP2509 einen signifikant erhöhten Anstieg.

Es lässt sich im Moment nicht implizieren, dass die günstige Wirkung von SP2509 auf die Induktion der p21-Expression zurückzuführen ist, vielmehr diene dieses Gen als eine Art Werkzeug, um zu untersuchen, ob SP2509 auf der mRNA-Ebene wirkt.

In jedem Fall kann die Cytarabin-sensibilisierende Wirkung der KDM1A-Inhibition von erheblicher klinischer Relevanz sein, da die Cytarabin-Behandlung die Hauptstütze der Kombinationsbehandlung bei AML darstellt.

5.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass in kindlichen AML-Blasten eine aberrant hohe Expression der KDM1A und eine niedrige der KDM6B vorliegt. Beide Isoenzyme könnten somit eine Rolle bei der AML-Entstehung spielen. Ihre Beeinflussung könnte bei der in Zukunft immer wichtiger werdenden personalisierten onkologischen Behandlung eine neue individuelle Therapiemöglichkeit, sowohl in Monotherapie als auch in Kombination mit Zytostatika, darstellen.

Die AML-Zellen waren weiterhin gegenüber der KDM1A-Inhibition durch den KDM1A-Antagonisten SP2509 *in vitro* sehr empfindlich. Ob dieser Effekt allein auf die KDM1A-Hemmung durch SP2509 zurückzuführen ist, bleibt offen und sollte in weiteren Untersuchungen an anderen AML-Zelllinien und mit weiteren spezifischen KDM1A-Inhibitoren, z. B. ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin, überprüft werden.

Es gibt außerdem eine mögliche Einschränkung für die klinische Verwendung von KDM1A-Inhibitoren. Das Potenzial von KDM1A als therapeutisches Ziel kann durch seine zentrale Funktion bei der Regulation der hämatopoetischen Differenzierung begrenzt sein (Spüssel et al. 2012, Kerenyi et al. 2013). Eine KDM1A-zielgerichtete Therapie könnte die Entwicklung normaler Zellen beeinträchtigen und somit schwere Nebenwirkungen hervorrufen. Auf der anderen Seite wurde der KDM1A-Inhibitor Tranylcypromin, der seit über fünfzig Jahren als Antidepressivum klinisch verwendet wird, nicht mit einer signifikanten hämatopoetischen Toxizität in Verbindung gebracht. Dennoch müssen mögliche Nebenwirkungen von KDM1A-Inhibitoren auf das Blut in klinischen Studien untersucht werden. Bisher wurden vier Phase-I-Studien mit KDM1A-Inhibitoren für erwachsene Patienten mit rezidivierter oder refraktärer AML eingeleitet.

KDM1A-Inhibitoren haben sich in Zelllinienmodellen verschiedener pädiatrischer solider Tumoren wie Neuroblastom, Osteosarkom, Medulloblastom und Ewing-Sarkom als wirksam erwiesen (Schulte et al. 2009, Bennani-Baiti et al. 2012, Pajtler et al. 2013, Sankar et al. 2014). Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie lässt sich die

Hypothese aufstellen, dass KDM1A auch ein vielversprechendes Arzneimittelziel für die Bekämpfung von kindlicher AML sein könnte, was in weiteren Studien untersucht werden sollte.

Warum es in den zwei AML-Zelllinien zu unterschiedlichen Effekten kam, ist noch ungeklärt. Eine Erklärung könnte sein, dass es sich bei der THP-1-Linie um Zellen eines Kindes handelt, während die KG-1-Zellen von einem Erwachsenen stammen. Eine bestätigende Untersuchung an weiteren kindlichen AML-Zelllinien wäre somit von Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde sich auf die Hemmung der KDM1A konzentriert. Es ist grundsätzlich einfacher, Enzymaktivitäten zu inhibieren als zu aktivieren, weshalb noch keine KDM-Aktivatoren zur Verfügung stehen, die für die Behandlung der aberrant niedriger KDM6B-Expression nötig gewesen wären. Durch die Unterexpression der KDM6B liegen die entsprechenden Histone und Proteine hypermethyliert vor. Eine Möglichkeit, dieser Hypermethylierung zu begegnen, wäre die Inhibition der verantwortlichen Histon-Lysin-Methyltransferasen (KMT), also die Hemmung der Methylierung anstelle der Aktivierung der Demethylierung. Im Falle der KDM6B, welche die Demethylierung von di- und trimethyliertem H3K27 katalysiert, könnte die KTM6 (auch als EZH2 bezeichnet) gehemmt werden, da diese H3K27 di- und trimethyliert. Der KTM6-Antagonist EPZ-6438 wird z. B. bereits in klinischen Phase-I-Studien zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen getestet (Copeland 2013). Der untersuchte KMT-Inhibitor müsste analog zu den hier durchgeführten Untersuchungen auf seine alleinige sowie die chemosensibilisierende Wirkung geprüft werden, um auch hier die Frage beantworten zu können, ob dieser KMT-Inhibitor alleine auf die Zellen proliferationshemmend wirkt oder ob die zytotoxische Wirkung der Zytostatika verstärkt wird.

Die Forschungsgruppe des onkologischen Forschungslabors der Kinderklinik Jena wird auch in Zukunft weiter an diesem interessanten Thema arbeiten.

6 Schlussfolgerung

Um die genaue Bedeutung der Lysin-Demethylasen in Tumoren aufzuzeigen, ist es erforderlich, die Expressionen der wichtigsten Isoenzyme tumorspezifisch zu analysieren. In diesem Projekt wurde erstmals die klinische Relevanz zehn ausgewählter KDMs in kindlicher akuter myeloischer Leukämie (AML) evaluiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die KDM1A als auch die KDM6B dabei als potenzielle therapeutische Angriffspunkte in der pädiatrischen AML aufgedeckt wurden, aufgrund ihrer veränderten Expressionshöhen im Vergleich zu gesunden Knochenmarkzellen.

Unter Verwendung eines niedermolekularen KDM1A-Inhibitors (SP2509) zeigte sich in einem kindlichen AML-Zelllinienmodell, dass die Hemmung von KDM1A zur Induktion des Zelltods und zu einer signifikanten Sensibilisierung für Cytarabin, dem derzeit wichtigsten Medikament in der pädiatrischen AML-Therapie, führt. Dies zeigte sich auch in der starken Erhöhung der p21-mRNA-Spiegel bei der Kombination von SP2509 und Cytarabin, was darauf hindeutet, dass SP2509 die Genexpression moduliert.

In der untersuchten adulten AML-Zelllinie entfaltete der KDM1A-Inhibitor bei alleiniger Behandlung eine deutliche Wirkung, ein chemosensibilisierender Effekt war hingegen nicht feststellbar.

Diese Dissertationsergebnisse leisten einen ersten Beitrag zur Bedeutung der KDMs bei kindlicher AML und zeigen, dass SP2509 und Cytarabin eine wirksame Kombination für die Behandlung von AML mit besonders schlechtem Chemotherapieansprechen sein kann und dass die Sensibilisierungswirkung der KDM1A-Hemmung auf Cytarabin von erheblicher klinischer Relevanz ist.

Mit dieser Dissertation konnte eine erste laborexperimentelle Grundlage für weitergehende Analysen gelegt werden, in denen die genaue Funktion der KDMs, die Wirksamkeit der spezifischen Hemmung sowie die Entwicklung spezifischer KDM-gerichteter Wirkstoffe in Hinblick auf Zelltod und Chemosensibilisierung überprüft werden sollte, sowohl bei AML wie auch bei anderen Tumorentitäten.

7 Anhang

7.1 Tabelle

KDM-Isoenzym	assoziierte Erkrankungen
KDM1A	überexprimiert beim Prostatakarzinom, undifferenziertem malignem Neuroblastom, Östrogen-Rezeptor-negativem Mammakarzinom, kolorektalen Karzinom, Blasen- und Lungenkarzinom unterexprimiert oder still bei Brustkrebs
KDM2B	bei verschiedenen Leukämieformen und beim Blasenkarzinom überexprimiert
KDM3B	-
KDM4A	beim Blasenkarzinom unterexprimiert oder still, beim Mammakarzinom überexprimiert
KDM4B	beim malignen peripheren Nervenscheidentumor überexprimiert
KDM4C	Überexprimiert beim Speiseröhrenkrebs, Mammakarzinom und Medulloblastom, in Lymphomen transloziert
KDM5A	still, herunterreguliert oder fehlend im Melanom; bei akuten Leukämien transloziert; mutiert bei Morbus Bechterew
KDM5B	beim Blasen-, Prostata- und Mammakarzinom überexprimiert
KDM6A (= <i>UTX</i>)	In verschiedenen Tumorarten einschließlich dem multiplen Myelom, ösophagealen Plattenepithelkarzinom, dem klarzelligen Nierenzellkarzinom, dem Übergangszellkarzinom und bei chronischer myelomonozytäre Leukämie mutiert, bei Brustkrebs überexprimiert und beim Kabuki-Syndrom fehlend
KDM6B	überexprimiert bei verschiedenen Lungen- und Leberkarzinomen, bei mehreren hämatologisch-malignen Erkrankungen, im primären Hodgkin-Lymphom und in Neutrophilen von Patienten mit ANCA-assoziierten Vaskulitiden

Tab. 17: Mit den KDM-Isoenzymen assoziierte Erkrankungen
aus Højfeldt et al. 2013

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Relative Häufigkeiten von Krebserkrankungen bei unter 18-jährigen Patienten in Deutschland von 2009 bis 2015	3
Abb. 2:	Überlebenswahrscheinlichkeit von Kindern mit AML in Deutschland von 1980 – 2013	4
Abb. 3:	Alters- und geschlechtsspezifische Inzidenz von AML pro 1 Million Kinder in Deutschland zwischen 2004 – 2013	4
Abb. 4:	Stammbaum der epigenetischen KDM-Familie	10
Abb. 5:	Reaktionsmechanismen der zwei unterschiedlichen KDM Familien.....	11
Abb. 6:	Dot Plots der THP-1 Zellen mit abgegrenzter Population 1 (P1).....	32
Abb. 7:	Histogramme der THP-1 Zellen	33
Abb. 8:	PCR-Amplifikationsplot.....	39
Abb. 9:	Relative KDM-Expression in gesunden Knochenmarkspendern und AML-Patienten	42
Abb. 10:	Zelltod und Verlust des $\Delta\Psi_m$ in THP-1-Zellen in Abhängigkeit von der SP2509-Konzentration nach 48 h und 72 h.....	45
Abb. 11:	Wirkung ausgewählter SP2509-Konzentrationen auf Zelltod und Verlust des $\Delta\Psi_m$ in THP-1-Zellen.....	45
Abb. 12:	Caspase-3-Aktivität in THP-1-Zellen nach SP2509-Behandlung.....	46
Abb. 13:	Zelltod und $\Delta\Psi_m$ -Verlust in THP-1-Zellen in Abhängigkeit der Etoposid-(A, B) und Cytarabinkonzentrationen (C, D).....	47
Abb. 14:	Wirkung von SP2509 und Etoposid auf den Zelltod (A) und den Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B).....	48
Abb. 15:	Wirkung von SP2509 und Etoposid auf die Caspase-3-Aktivität in THP-1-Zellen.....	49
Abb. 16:	Wirkung von SP2509 und Cytarabin auf den Zelltod (A) sowie den Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in THP-1-Zellen.....	50
Abb. 17:	Wirkung von SP2509 und Cytarabin auf die Caspase-3-Aktivität in THP-1-Zellen.....	51
Abb. 18:	Wirkung ausgewählter SP2509- Konzentrationen auf den Zelltod (A) und den Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in KG-1-Zellen.....	52
Abb. 19:	Caspase-3-Aktivität in KG-1-Zellen nach SP2509-Behandlung.....	53

Abb. 20: Zelltod und $\Delta\Psi_m$ -Verlust in KG-1-Zellen in Abhängigkeit der Etoposid-(A, B) und Cytarabinkonzentrationen (C, D).....	54
Abb. 21: Wirkung von SP2509 und Etoposid auf den Zelltod (A) sowie den Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in KG-1-Zellen.....	55
Abb. 22: Wirkung von SP2509 und Etoposid auf die Caspase-3-Aktivität in KG-1-Zellen.....	56
Abb. 23: Wirkung von SP2509 und Cytarabin auf den Zelltod (A) sowie den Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in KG-1-Zellen	57
Abb. 24: Wirkung von SP2509 und Cytarabin auf die Caspase-3-Aktivität in KG-1-Zellen.....	58
Abb. 25: Wirkung von 20 μ M Z-VAD auf den Zelltod (A) und den Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in THP-1 Zellen.....	60
Abb. 26: Wirkung von 20 μ M Z-VAD auf den Zelltod (A) und den Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in KG-1-Zellen	60
Abb. 27: Relative p21-mRNA-Expression bei behandelten THP-1-Zellen	61

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Allgemein verwendete Geräte	19
Tab. 2:	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	20
Tab. 3:	Verwendete Reagenzien, Medien, Puffer und Kits	21
Tab. 4:	Übersicht relevanter klinischer Parameter der 50 untersuchten AML-Patienten	23
Tab. 5:	Eingesetzte Wirkstoffe und ihre Eigenschaften.....	27
Tab. 6:	Caspase-3-Lysepuffer für 50 ml	29
Tab. 7:	Caspase-3-Aktivitätspuffer für 1 ml	29
Tab. 8:	Eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Eigenschaften	30
Tab. 9:	Transkriptionsreagenzien, 7,25 µl pro Probe	36
Tab. 10:	PCR Reagenzien, 25 µl pro Probe	38
Tab. 11:	KDM-Expressionen der gesunden Knochenmarkspender und AML-Patienten	41
Tab. 12:	Zusammenhang der KDM-Expressionen mit verschiedenen klinischen Parametern	43
Tab. 13:	CI-Werte für SP2509 zusammen mit Etoposid in THP-1-Zellen.....	49
Tab. 14:	CI-Werte für SP2509 zusammen mit Cytarabin in THP-1-Zellen	51
Tab. 15:	CI-Werte für SP2509 zusammen mit Etoposid in KG-1-Zellen.....	56
Tab. 16:	CI-Werte für SP2509 zusammen mit Cytarabin in KG-1-Zellen.....	58
Tab. 17:	Mit den KDM-Isoenzymen assoziierte Erkrankungen	71

7.4 Literaturverzeichnis

- Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M. 2012. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 11(5):384-400.
- Baylin SB, Jones PA. 2011. A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications. *Nature Reviews Cancer*, 11(10):726-734.
- Bennani-Baiti IM, Machado I, Llombart-Bosch A, Kovar H. 2012. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1A/AOF2/BHC110) is expressed and is an epigenetic drug target in chondrosarcoma, Ewing's sarcoma, osteosarcoma, and rhabdomyosarcoma. *Human pathology*, 43(8):1300-1307.
- Bustin SA. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*, 29(1):23-39.
- Cai SF, Chen CW, Armstrong SA. 2015. Drugging Chromatin in Cancer: Recent Advances and Novel Approaches. *Molecular cell*, 60(4):561-570.
- Chen J, Odenike O, Rowley JD. 2010. Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nature Reviews Cancer*, 10(1):23-36.
- Chou TC, Talalay P. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in enzyme regulation*, 22:27-55.
- Cohen SS. 1977. The mechanisms of lethal action of arabinosyl cytosine (araC) and arabinosyl adenine (araA). *Cancer*, 40(S1):509-518.
- Copeland RA. 2013. Molecular Pathways: Protein methyltransferases in cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(23):6344-6350.
- Creutzig U, Zimmermann M, Ritter J, Henze G, Graf N, Löffler H, Schellong G. 1999. Definition of a standard-risk group in children with AML. *British journal of haematology*, 104(3):630-639.
- Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, de Bont E, Harbott J, Henrik H, Johnston D, Kinoshita A, Leverger G, Mejstrikova E, Meshinchi S, Pession A, Raimondi SC, Sung L, Sary J, Zwaan CM, Kaspers GJL, Reinhardt D. 2012. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood*, 120(16):3187-3205.
- Creutzig U, Dworzak M, Reinhardt D. 2013. Akute lymphoblastische (ALL) und akute myeloische (AML) Leukämie im Kindesalter. Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie. AWMF online, http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-031l_S1_Akute_myeloische_Leukämie_im_Kindesalter_2013-02.pdf
- Dastugue N, Payen C, Lafage-Pochitaloff M, Bernard P, Leroux D, Huguet-Rigal F, Stoppa AM, Marit G, Molina L, Michallet M. 1995. Prognostic significance of karyotype in de novo adult acute myeloid leukemia. The BGMT group. *Leukemia*, 9(9):1491-1498.

- Dawson MA, Kouzarides T. 2012. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, 150(1):12-27.
- De Rooij JD, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink M. 2015. Pediatric AML: From Biology to Clinical Management. *Journal of Clinical Medicine*, 4(1):127-149.
- D'Oto A, Tian QW, Davidoff AM, Yang J. 2016. Histone demethylases and their roles in cancer epigenetics. *Journal of medical oncology and therapeutics*, 1(2):34.
- Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larsen RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD. 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115(3):453-474.
- Ene CI, Edwards L, Riddick G, Baysan M, Woolard K, Kotliarova S, Zhou M, Lai C, Belova G, Cam M, Walling J, Stevenson H, Kim HS, Killian K, Veenstra T, Bailey R, Song H, Zhang W, Fine HA. 2012. Histone demethylase Jumonji D3 (JMJD3) as a tumor suppressor by regulating p53 protein nuclear stabilization. *PloS one*, 7(12):e51407.
- Esteller M. 2008. Epigenetics in cancer. *New England Journal of Medicine*, 358 (11):1148-1159.
- Fiskus W, Sharma S, Shah B, Portier BP, Devaraj SGT, Liu K, Iyer SP, Bearss D, Bhalla KN. 2014. Highly effective combination of LSD1 (KDM1A) antagonist and pan-histone deacetylase inhibitor against human AML cells. *Leukemia*, 28(11):2155-2164.
- Flavahan WA, Gaskell E, Bernstein BE. 2017. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science*, 357(6348):266.
- Fong CY, Morison J, Dawson MA. 2014. Epigenetics in the hematologic malignancies. *haematologica*, 99(12):1772-1783.
- Ginzinger DG. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental hematology*, 30(6):503-512.
- Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. 2007. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 128(4):635-638.
- Greer EL, Shi Y. 2012. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 13(5):343-357.
- Gruhn B, Naumann T, Gruner D, Walther M, Wittig S, Becker S, Beck JF, Sonnemann J. 2013. The expression of histone deacetylase 4 is associated with prednisone poor-response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research*, 37(10):1200-1207.
- Hande KR. 2008. Topoisomerase II inhibitors. update on cancer therapeutics, 3(1):13-26.
- Harris WJ, Huang X, Lynch JT, Spencer GJ, Hitchin JR, Li Y, Ciceri F, Blaser JG, Greystoke BF, Jordan AM, Miller CJ, Donald J, Ogilvie DJ, Somerville TCP. 2012. The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells. *Cancer Cell*, 21(4):473-87.

- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88 (16):7276-7280.
- Højfeldt JW, Agger K, Helin K. 2013. Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 12(12):917-930.
- Huang J, Sengupta R, Espejo AB, Lee MG, Dorsey JA, Richter M, Opravil S, Shiekhatar R, Bedford MT, Jenuwein T, Berger SL. 2007. p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature*, 449(7158):105-8.
- Huang Y, Vasilatos SN, Boric L, Shaw PG, Davidson NE. 2012. Inhibitors of histone demethylation and histone deacetylation cooperate in regulating gene expression and inhibiting growth in human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*, 131(3):777-789.
- Jones PA, Baylin SB. 2007. The epigenomics of cancer. *Cell*, 128 (4):683-692.
- Kaatsch P, Grabow D, Spix C. 2016. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2016 (1980-2015). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz.
- Kaspers GJ, Zimmermann M, Reinhardt D, Gibson BE, Tamminga RY, Aleinikova O, Armendariz H, Dworzak M, Ha SY, Hasle H, Hovi L, Maschan A, Bertrand Y, Leverger GG, Razzouk BI, Rizzari C, Smisek P, Smith O, Stark B, Creutzig U. 2013. Improved outcome in pediatric relapsed acute myeloid leukemia: results of a randomized trial on liposomal daunorubicin by the International BFM Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, 31(5):599-607.
- Kerenyi MA, Shao Z, Hsu YJ, Guo G, Luc S, O'Brien K, Fujiwara Y, Peng C, Nguyen M, Orkin SH. 2013. Histone demethylase *Lsd1* represses hematopoietic stem and progenitor cell signatures during blood cell maturation. *Elife*, 2, e00633.
- Ketscher A, Jilg CA, Willmann D, Hummel B, Imhof A, Rüsseler V, Hölz S, Metzger E, Müller JM, Schüle R. 2014. LSD1 controls metastasis of androgen-independent prostate cancer cells through PXN and LPAR6. *Oncogenesis*, 3(10):e120-e120.
- Kooistra SM, Helin K. 2012. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(5):297-311.
- Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4):693-705.
- Kozono D, Li J, Nitta M, Sampetean O, Gonda D, Kushwaha DS, Merzon D, Ramakrishnan V, Zhu S, Zhu K, Matsui H, Harismendy O, Hua W, Mao Y, Kwon CH, Saya H, Nakano I, Pizzo DP, Van Den Berg SR, Chen CC. 2015. Dynamic epigenetic regulation of glioblastoma tumorigenicity through LSD1 modulation of MYC expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112(30):E4055-E4064.
- Lane DP. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358:15-16.
- Lee LG, Connell CR, Bloch W. 1993. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic acids research*, 21(16):3761-3766.

- Liu J, Zhang C, Hu W, Feng Z. 2015. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer letters*, 356(2):197-203.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. *methods*, 25(4):402-408.
- Loeffler M, Kroemer G. 2000. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Experimental cell research*, 256(1):19-26.
- Maes T, Carceller E, Salas J, Ortega A, Buesa C. 2015. Advances in the development of histone lysine demethylase inhibitors. *Current opinion in pharmacology*, 23:52-60.
- Mohammad HP, Smitheman KN, Kamat CD, Soong D, Federowicz KE, Van Aller GS, Schneck JL, Carson JD, Liu Y, Butticello M, Bonnette WG, Gorman SA, Degenhardt Y, Bai Y, McCabe MT, Pappalardi MB, Kaspavec J, Tian X, McNulty KC, Rouse M, McDevitt P, Ho T, Crouthamel M, Hart TK, Concha NO, McHugh CF, Miller WH, Dhanak D, Tummino PJ, Carpenter CL, Johnson NW, Hann CL, Kruger RG. 2015. A DNA hypomethylation signature predicts antitumor activity of LSD1 inhibitors in SCLC. *Cancer Cell*, 28(1):57-69.
- Müller S, Kramer OH. 2010. Inhibitors of HDACs-effective drugs against cancer? *Current cancer drug targets*, 10(2):210-228.
- Neff T, Armstrong SA. 2013. Recent progress toward epigenetic therapies: the example of mixed lineage leukemia. *Blood*, 121(24):4847-4853.
- Pajtlér KW, Weingarten C, Thor T, Künkele A, Heukamp LC, Büttner R, Suzuki T, Miyata N, Grotzer M, Rieb A, Eggert A, Schramm A, Schulte JH, Sprüssel A. 2013. The KDM1A histone demethylase is a promising new target for the epigenetic therapy of medulloblastoma. *Acta neuropathologica communications*, 1(1):19.
- Porter AG, Jänicke RU. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation*, 6(2):99-104.
- Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. 2011. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *Journal of Clinical Oncology*, 29(5):551-565.
- Ribeiro RC. 2014. Advances in treatment of de-novo pediatric acute myeloid leukemia. *Current opinion in oncology*, 26(6):656-662.
- Riccardi C, Nicoletti I. 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*, 1(3):1458-1461.
- Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, Ribeiro RC, Bowman WP, Taub J, Pounds S, Razzouk BI, Lacayo NJ, Cao X, Meshinchi S, Degar B, Airewele G, Raimondi SC, Onciu M, Coustan-Smith E, Downing JR, Leung W, Pui CH, Campana D. 2010. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol*, 11(6):543-552.
- Rubnitz JE, Inaba H. 2012. Childhood acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology*, 159(3):259-276.

- Sander A, Zimmermann M, Dworzak M, Fleischhack G, Von Neuhoff C, Reinhardt D, Kaspers GJ, Creutzig U. 2010. Consequent and intensified relapse therapy improved survival in pediatric AML: results of relapse treatment in 379 patients of three consecutive AML-BFM trials. *Leukemia*, 24(8):1422.
- Sankar S, Theisen ER, Bearss J, Mulvihill T, Hoffman LM, Sorna V, Beckerle MC, Sharma S, Lessnick SL. 2014. Reversible LSD1 inhibition interferes with global EWS/ETS transcriptional activity and impedes Ewing sarcoma tumor growth. *Clinical cancer research*, 20(17):4584-4597.
- Schenk T, Chen WC, Gollner S, Howell L, Jin L, Hebestreit K, Klein HU, Popescu AC, Burnett A, Mills K, Casero Jr. RA, Marton L, Woster P, Dugas M, Wang JCY, Dick JE, Müller-Tidow C, Petrie K, Zelent A. 2012. Inhibition of the LSD1 (KDM1A) demethylase reactivates the all-trans-retinoic acid differentiation pathway in acute myeloid leukemia. *Nat Med*. 18(4):605-11.0
- Schulte JH, Lim S, Schramm A, Friedrichs N, Koster J, Versteeg R, Ora I, Pajtler K, Klein-Hitpass L, Kuhfittig-Kulle S, Schüle R, Eggert A, Buettner R, Kirfel J, Metzger E. 2009. Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. *Cancer research*, 69(5):2065-2071.
- Sekeres MA, Elson P, Kalaycio ME, Advani AS, Copelan EA, Faderl S, Kantarjian HM, Estey E. 2009. Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood*, 113(1):28-36.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 119(7):941-953.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2016. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(1):7-30.
- Slevin ML. 1991. The clinical pharmacology of etoposide. *Cancer*, 67(S1):319-329.
- Sonnemann J, Gruhn B, Wittig S, Becker S, Beck JF. 2012. Increased activity of histone deacetylases in childhood acute lymphoblastic leukaemia and acute myeloid leukaemia: support for histone deacetylase inhibitors as antileukaemic agents. *British journal of haematology*, 158(5):664-666.
- Sorna V, Theisen ER, Stephens B, Warner SL, Bearss DJ, Vankayalapati H, Sharma S. 2013. High-throughput virtual screening identifies novel N'-(1-phenylethylidene)-benzohydrazides as potent, specific, and reversible LSD1 inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 56(23):9496-9508.
- Soussi T, Bérout C. 2001. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*, 1(3):233-239.
- Sprüssel A, Schulte JH, Weber S, Necke M, Händschke K, Thor T, Pajtler KW, Schramm A, König K, Diehl L, Vandesompele J, Speleman F, Jastrow H, Heukamp LC, Schule R, Duhrsen U, Buettner R, Eggert A, Gothert JR, Mestdagh P. 2012. Lysine-specific demethylase 1 restricts hematopoietic progenitor proliferation and is essential for terminal differentiation. *Leukemia*, 26(9):2039.

- Sugimoto K, Toyoshima H, Sakai R, Miyagawa K, Hagiwara K, Ishikawa F, Takaku F, Yazaki Y, Hirai H. 1992. Frequent mutations in the p53 gene in human myeloid leukemia cell lines. *Blood*, 79(9):2378-2383.
- Taby R, Issa JP. 2010. Cancer epigenetics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 60 (6):376-392.
- Theisen ER, Gajiwala S, Bearss J, Sorna V, Sharma S, Janat-Amsbury M. 2014. Reversible inhibition of lysine specific demethylase 1 is a novel anti-tumor strategy for poorly differentiated endometrial carcinoma. *BMC cancer*, 14(1):752.
- Thinnes CC, England KS, Kawamura A, Chowdhury R, Schofield CJ, Hopkinson RJ. 2014. Targeting histone lysine demethylases - Progress, challenges, and the future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 1839(12):1416-1432.
- Tian X, Zhang S, Liu HM, Zhang YB, Blair CA, Mercola D, Sassone-Corsi P, Zi X. 2013. Histone lysine-specific methyltransferases and demethylases in carcinogenesis: new targets for cancer therapy and prevention. *Current cancer drug targets*, 13(5):558.
- Wada T, Koyama D, Kikuchi J, Honda H, Furukawa Y. 2015. Overexpression of the shortest isoform of histone demethylase LSD1 primes hematopoietic stem cells for malignant transformation. *Blood*, 125(24):3731-3746.
- Wang J, Lu F, Ren Q, Sun H, Xu Z, Lan R, Liuz Y, Warda D, Quan J, Ye T, Zhang H. 2011. Novel histone demethylase LSD1 inhibitors selectively target cancer cells with pluripotent stem cell properties. *Cancer research*, 71(23):7238-7249.
- Wang Y, Zhang H, Chen Y, Sun Y, Yang F, Yu W, Li R, Liang J, Sun L, Yang X, Shi L, Li Y, Zhang Y, Li Q, Yi X, Shang Y. 2009. LSD1 is a subunit of the NuRD complex and targets the metastasis programs in breast cancer. *Cell*, 138(4):660-672.
- Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. 2014. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 64(2):83-103.
- Williams K, Christensen J, Rappsilber J, Nielsen AL, Johansen JV, Helin K. 2014. The histone lysine demethylase JMJD3/KDM6B is recruited to p53 bound promoters and enhancer elements in a p53 dependent manner. *PloS one*, 9(5):e96545.
- Witt O, Milde T, Deubzer HE, Oehme I, Witt R, Kulozik A, Eisenmenger A, Abel U, Karapanagiotou-Schenkel I. 2012. Phase I/II intra-patient dose escalation study of vorinostat in children with relapsed solid tumor, lymphoma or leukemia. *Klinische Padiatrie*, 224(6):398-403.
- Wolf BB, Green DR. 1999. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 274(29):20049-20052.
- Wu J, Hu L, Du Y, Kong F, Pan Y. 2015. Prognostic role of LSD1 in various cancers: evidence from a meta-analysis. *OncoTargets and therapy*, 8:2565.
- Yin B, Kogan SC, Dickins RA, Lowe SW, Largaespada DA. 2006. Trp53 loss during in vitro selection contributes to acquired Ara-C resistance in acute myeloid leukemia. *Experimental hematology*, 34(5):631-641.

Zwaan CM, Kolb EA, Reinhardt D, Abrahamsson J, Adachi S, Aplenc R, De Bont ESJM, Moerlose B, Dworzak M, Gibson BES, Hasle H, Leverger G, Locatelli F, Ragu C, Ribeiro RC, Rizzari C, Rubnitz JE, Smith OP, Sung L, Tomizawa D, van den Heuvel-Eibrink MM, Creutzig U, Kaspers GJL. 2015. Collaborative efforts driving progress in pediatric acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 33(27):2949-2962.

7.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den nachstehenden Personen bedanken, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre:

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. James F. Beck für die Überlassung dieses Themas, die gute Zusammenarbeit, die regelmäßigen Besprechungen und die vielen konstruktiven Ratschläge. Es war mir eine Ehre, im Labor der Kinderklinik Jena promovieren zu dürfen.

Ein großer Dank gilt Dr. Jürgen Sonnemann für die Unterstützung bei der Bearbeitung meiner Dissertation, für die Überlassung notwendiger Quellen und Dokumente, das ständig offene Ohr, die sachlichen Hinweise und das stets zügige Korrigieren.

Sabine Becker danke ich für die ausgezeichnete und akribische Einarbeitung in die Labormethoden. Von Ihrer jahrelangen praktischen Erfahrung konnte ich nur profitieren und die vielen netten Gespräche während der Experimente im Labor sorgten für ein stets angenehmes Arbeitsklima.

Ein weiterer Dank geht an meine Mitdoktorandinnen sowie Kolleginnen Marie Kühn und Elisabeth Walter für die außerordentlich gute Zusammenarbeit, die gegenseitige Hilfe und Unterstützung.

Bei Prof. Dr. Bernd Gruhn und Susan Wittig möchte ich mich für die Bereitstellung der Patientenproben sowie für die Benutzung des PCR-Gerätes bedanken.

Vielen Dank an Dr. Mario Walther für die zahlreichen Hinweise und die Hilfe bei der Durchführung der statistischen Auswertungen.

Beim IZKF Jena bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, im Rahmen des sechsmonatigen Promotionsstipendiums.

Tief verbunden und dankbar bin ich meinem kleinen Sohn Emil und meinem Ehemann, für die moralische Unterstützung, das Verständnis, die Ablenkung und die Ermutigung zur Fertigstellung dieser Doktorarbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Großeltern meiner Schwester, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet haben, die mich stets unterstützen und mir mit Rat und Tat zur Seite stehen. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

7.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. J. F. Beck, Dr. J. Sonnemann, Prof. Dr. B. Gruhn, Dr. Mario Walther, Sabine Becker, Susan Wittig, Elisabeth Walter und Marie Kühne,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 08. August 2018

Franziska Ebert